Ricardo dos Santos Simões

**Perfil dos glicosaminoglicanos no útero de ratas
ooforectomizadas e tratadas com estrogênios e/ou
progestagênios**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Simões, Ricardo dos Santos

Perfil dos glicosaminoglicanos no útero de ratas ooforectomizadas e tratadas com estrôgenios e/ou progestagênios / Ricardo dos Santos Simões. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Edmund Chada Baracat.

Descritores: 1.Glicosaminoglicanos 2.Estrogênios conjugados 3. Acetato de medroxiprogesterona 4.Ratas 5.Útero

USP/FM/DBD-176/10

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”

Cora Coralina

Dedicatória

Dedico este trabalho

*Aos meus pais **Manuel** e **Graciete** pelo amor incondicional e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história*

*Aos meus irmãos **Fabiana** e **André**, pela convivência e estímulo constante*

*A minha futura esposa **Ligia**, por acreditar nos meus sonhos diariamente e nas prioridades da vida*

Ao Orientador

Ao ***Professor Dr. Edmund Chada Baracat***, Professor Titular do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), orientador deste trabalho desde o seu início, como aluno de iniciação científica, obrigado pela amizade, compreensão, incentivo, pelos ensinamentos e pelas oportunidades que tem me proporcionado no convívio diário. Qualquer palavra de agradecimento longe ficaria da verdade, pois nossa vida acadêmica, profissional e científica é nele inspirado. O meu muito obrigado.

Homenagem Especial

Ao Prof. Dr. *Carl Peter von Dietrich* “*in memória*” e à Prof^a. Dr^a *Helena Bonciani Nader* Professores Titulares do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo, pela acolhida como aluno de Iniciação Científica em 2000, onde como aluno de graduação fui iniciado nesta linha de pesquisa, seus exemplos de vida científica nos marcaram profundamente, obrigado por tê-los conhecido;

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. *José Maria Soares Júnior*, Professor Associado do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo, pelos ensinamentos e oportunidades que nos proporcionou no dia a dia, nossa eterna gratidão;

Aos Professores Doutores que compuseram a banca Examinadora de Qualificação deste trabalho que, com suas apreciações muito bem elaboradas, permitiram-nos aprofundar e melhorar a qualidade desta tese que vinha sendo construída: Prof^a Dr^a. *Ângela Maggio da Fonseca* (USP), Prof. Dr. *José Maria Soares Júnior* (UNIFESP) e Dr. *Gustavo Arantes Rosa Maciel* (USP);

Ao Prof. Dr. *Ricardo Martins de Oliveira Filho*, Professor do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelas sugestões dadas na parte farmacológica;

Ao Prof. Dr. *Adelino Moreira de Carvalho*, amigo de longa data, coordenador do Curso de Medicina de Alfenas (UNIFENAS) e professor de português, muito obrigado pela correção do vernáculo;

Aos colegas e amigos do Departamento de Bioquímica, em especial da Disciplina de Biologia Molecular e do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo, pelo apoio e pelo incentivo;

À *Claudia Aparecida Vieira* pela ajuda, gentileza e disponibilidade nas dificuldades de nossa trajetória no Curso de pós-graduação e também no auxílio da formatação deste trabalho.

CONFLITO DE INTERESSE

Este trabalho não apresenta nenhum conflito de interesse.

O desenvolvimento desta pesquisa ocorreu nos Laboratórios de Ginecologia Estrutural e Molecular da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – LIM 58 (USP/LIM-58), no Laboratório da Disciplina de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM) e no Biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM).

Sumário

Lista de Símbolos

Lista de Siglas e Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.2. Revisão da Literatura	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Material	15
3.2. Métodos	16
3.2.1. Ooforectomia	16
3.2.2. Coleta e processamento do material	17
3.2.3. Extração e determinação dos glicosaminoglicanos sulfatados(GAGs)	18
3.2.4. Eletroforese em gel de agarose	19
3.2.5. Quantificação do ácido hialurônico	20
3.2.6. Quantificação do AH pelo método fluorométrico ELISA-like	21
3.2.7. Ensaio tipo sanduíche do ácido hialurônico	22
3.2.8. Cálculo do tamanho da amostra	23

3.2.9. Método estatístico	23
4. RESULTADOS	24
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÕES	36
7. ANEXO	37
8. REFERÊNCIAS	38

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo:

Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Lista de Símbolos

%	por cento
<	menor que
≤	maior ou igual que
≥	maior ou igual que
°C	graus Celsius
μg	micrograma
μL	microlitro
C	carbono
cm	centímetro
D.P	desvio padrão
g	grama
G	Unidade de medida de força centrífuga
GL	Gay – Lussac
Kg	quilograma
L	microlítro
M	molar (mol/L).
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	micromolar
mm	milímetro
nm	nanômetro
°C	grau Celsius
P.M	peso molecular

V Volt

α alfa

β beta

Lista de Abreviaturas e Siglas

GlcNAc	N-acetilglucosamina
<i>Ad libitum</i>	Termo latino que significa à vontade.
AH	Ácido hialurônico
AMP	Acetato de medroxiprogesterona
ANOVA	Análise de variância
BSA	Soro albumina bovina
CEDEME	Centro de desenvolvimento de modelos experimentais em medicina e biologia.
CETAVLON	Brometo de cetiltrimetilamônio
Co	Company
CS	Condroitim sulfato
DPM	Desvio padrão da média
DS	Dermatam sulfato
ECE	Estrogênios conjugados eqüinos
ELISA	Teste imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
EPM	Escola Paulista de Medicina
et al	Abreviação de uma expressão latina <i>Et alii</i> que significa "e outros"
FGF-7	Fator de crescimento de queratinócitos
Fig.	Figura
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GAG	Glicosaminoglicano
GAGs	Glicosaminoglicanos sulfatados
GlcNAc	N- acetilglucosamina
GlcUA	D-glucurônico

HAS	Hialuronan sintase
HEP	Heparina
HS	Heparam sulfato
IL	Interleucina
MEC	Matriz extracelular
P.M	Peso molecular
PGs	Proteoglicanos
pH	Potencial hidrogeniônico
QS	Queratam sulfato
RHAMM	Molécula de reconhecimento ao AH nos processos de migração-específica
TCA	Ácido tricloroacético
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo

Lista de Figuras

Figura 1	Unidades estruturais dos principais glicosaminoglicanos.	5
Figura 2	Esquema mostrando porção do trato genital da rata, onde se observa parte da vagina, o colo e parte dos cornos uterinos	18
Figura 3	Esquema do método fluorométrico	21
Figura 4	Comportamento eletroforético dos glicosaminoglicanos sulfatados presentes nos colos dos úteros de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo.	26
Figura 5	Comportamento eletroforético dos glicosaminoglicanos sulfatados presentes nos cornos uterinos de ratas pertencentes aos vários grupos	27
Figura 6	Gráficos mostrando a concentração dos glicosaminoglicanos obtidos nos colos e nos cornos uterinos de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo.	30

Lista de Tabelas

Tabela 1	Características estruturais dos glicosaminoglicanos	6
Tabela 2	Análise quantitativa dos glicosaminoglicanos no colo uterino de ratas em diferentes condições hormonais	28
Tabela 3	Análise quantitativa dos glicosaminoglicanos no corno uterino de ratas em diferentes condições hormonais	29

Resumo

Simões, RS. Perfil dos glicosaminoglicanos no útero de ratas ooforectomizadas e tratadas com estrogênios e/ou progestagênios [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010, 65 p.

Objetivo: Avaliar os efeitos dos estrogênios conjugados eqüinos (ECE), isolados ou associados ao acetato de medroxiprogesterona (AMP) sobre os glicosaminoglicanos do colo e do corno do útero de ratas. **Métodos:** 40 ratas adultas, após 30 dias de ooforectomia foram distribuídas em quatro grupos: GI – controle (veículo); GII – ECE (50 µg/Kg, por dia); GIII – AMP (0,2 mg/Kg, por dia) e GIV – ECE (50 µg/Kg, por dia) + AMP (0,2 mg/Kg, por dia). As substâncias foram administradas por gavagem por 28 dias consecutivos, sendo que ao final, após anestesia, o colo e o corpo do útero foram retirados e mergulhados em acetona para detecção e quantificação dos glicosaminoglicanos. Os glicosaminoglicanos sulfatados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e o ácido hialurônico a ensaio fluorimétrico (ELISA-like). Os resultados foram analisados pelo teste de *t* de Student e de ANOVA, complementado pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0,05$). **Resultados:** Foi detectada, em todos os grupos, maior concentração de glicosaminoglicanos sulfatados tanto no colo como nos cornos uterinos, em especial do dermatam sulfato. Já a concentração de ácido hialurônico foi maior no corno do que no colo. Com relação ao dermatam sulfato, os estrogênios promoveram incremento, tanto no colo quanto no corpo, sendo que a medroxiprogesterona bloqueou esta ação nos cornos uterinos. Os estrogênios e a medroxiprogesterona, por sua vez, apresentaram ação positiva

nos níveis de heparam sulfato no colo do útero, já no corno este efeito foi atribuído à medroxiprogesterona. **Conclusões:** O perfil e a quantificação dos glicosaminoglicanos nas duas porções do útero de ratas são diferentes. Os glicosaminoglicanos sulfatados, em especial o dermatam sulfato, mostrou-se em maior concentração tanto no colo quanto no corno uterino. Os estrogênios e a medroxiprogesterona têm ação positiva nos glicosaminoglicanos sulfatados do colo, enquanto a medroxiprogesterona apresenta efeito antagônico no corno. O ácido hialurônico apareceu em maior concentração no corno do que no colo uterino.

Descritores: Glicosaminoglicanos. Estrogênios conjugados. Acetato de medroxiprogesterona. Ratas. Útero.

Summary

Simões, RS. Profiles of glycosaminoglycans in the uterus of adult oophorectomized rats treated with estrogen and/or progestagen [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010, 65 p.

Objective: To evaluate the effects of conjugated equine estrogens (CEE) alone or associated to medroxyprogesterone acetate (MPg) on glycosaminoglycans (GAGs) in the cervix and horns of the rat uterus. **Methods:** Thirty days after ovariectomy, 40 adult rats were randomly divided into four groups: GI, control (treated with drug vehicle); GII, CEE (50 µg/Kg per day); GIII, MPg (0.2 mg/Kg per day), and GIV, CEE + MPg (doses as in GII and GIII). Drugs and vehicle were given by gavage during 28 days. After this the animals were euthanized, the uterine cervix and body were removed, fixed in acetone and further processed for GAGs quantification. Agarose gel electrophoresis was used for sulphated GAGs analyses; the hyaluronic acid was assayed with an ELISA-like method. Statistical analysis was done by the Student's t test and the Tukey-Kramer test. Significant differences were set at $p \leq 0.05$. **Results:** In all groups sulphated GAGs concentration (especially dermatan sulphate) was higher than that of non-sulphated GAGs, both in the cervix and in the uterine horns. Hyaluronic acid concentration in uterine horns was higher than in the cervix. With regard to dermatan sulphate, CEE exerted trophic effects both in horns and cervixes, whereas MPg blocked this action in the uterine horn. The cervical concentration of heparan sulphate was raised by CEE and by MPg; in the uterine horns the same rise was observed, and this effect was attributed to MPg. **Conclusions:** The

qualitative and quantitative profiles of GAGs in the horns and cervix of rat uterus are distinct. Sulphated GAGs (especially dermatan sulphate) are more concentrated than the non-sulphated ones in both uterine regions. With regard to sulphated GAGs, estrogens and medroxyprogesterone have trophic actions on sulphated GAGs at the cervix, whereas at the uterine horn MPg shows an antagonistic action. The concentration of hyaluronic acid in the uterine horns was higher than in the cervix.

Descriptors: Glycosaminoglycans. Estrogens, conjugated. Medroxyprogesterone acetate. Uterus. Rats.

1. Introdução

Atualmente, a terapia hormonal é considerada tanto como tratamento de escolha para o alívio dos sintomas relacionados à menopausa, tais como alterações do sono, fogachos, secura vaginal, perda da libido e alterações de humor ¹⁻⁴, quanto na prevenção e tratamento da osteoporose ^{5,6}. No entanto, diversos estudos têm atribuído à terapia estrogênica ou estroprogestativa o surgimento de efeitos colaterais como aumento no risco de câncer de mama e de endométrio além de tromboembolismo. Desta forma, seu uso tem sido mais limitado ⁷⁻⁹.

Até alguns anos atrás, o principal elemento relacionado ao aparecimento de tumores eram alterações nas próprias células. No entanto, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, passou-se a analisar a relação entre as células e o seu meio, ou seja, a matriz extracelular. Nesse sentido, vários autores voltaram sua atenção para alguns componentes desta matriz, em especial os glicosaminoglicanos e sua eventual ligação com a terapia hormonal.

A matriz extracelular (MEC) é composta por um conjunto de agregados supramoleculares, constituídos estes por uma rede molecular contendo colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos, que mantêm as células associadas, possibilitando a organização dos tecidos e a sobrevivência celular ^{10,11}.

Os proteoglicanos (PGs) são macromoléculas formadas por um esqueleto protéico ao qual estão covalentemente ligadas cadeias de glicosaminoglicanos. Estão presentes na matriz, na membrana basal e na superfície celular, como também intracelularmente em grânulos secretórios ¹¹⁻¹⁴. Os proteoglicanos diferenciam-se das glicoproteínas por possuírem, ligada ao esqueleto protéico, pelo menos uma cadeia de glicosaminoglicano. O esqueleto protéico é o molde para a ligação dos glicosaminoglicanos, sendo responsável pelo tráfego intracelular pela via biossintética secretora e pela interação com outros açúcares por domínios específicos na molécula. A proteína dos PGs é capaz de interagir com o ácido hialurônico assim como com outras proteínas da matriz extracelular e também com membranas celulares, como nos PGs de superfície celular.

A possibilidade de variação estrutural da proteína central (esqueleto protéico) e dos glicosaminoglicanos, bem como a variação do número de cadeias e do grau de sulfatação, tudo isto permite ampla gama de arranjos, sendo atualmente descritos mais de quarenta tipos diferentes de proteoglicanos, associados a funções bastante diversas no organismo. Atuam como organizadores teciduais, influenciando o crescimento celular e a maturação de tecidos especializados. Além disso, têm importante papel como filtros biológicos, regulam a hidrólise do colágeno, afetam o crescimento e a invasão tumoral, entre outras funções. Alterações na organização dos proteoglicanos podem interferir profundamente com as propriedades dos tecidos ^{15,16}.

Os glicosaminoglicanos possibilitam várias funções como a hidratação dos espaços ao redor das células, formando géis que variam quanto ao tamanho dos poros e à densidade da carga, atuando como filtros. Estes regulam a passagem de moléculas através do meio extracelular. Podem ainda se ligar a fatores de

crescimento ou a outras proteínas, que servem como sinais de estímulo ou de bloqueio na orientação da migração celular através da matriz extracelular ^{10,17}.

São carboidratos com estrutura dissacarídica básica e repetitiva. As unidades dissacarídicas dos glicosaminoglicanos são formadas, em geral, por um monossacarídeo (glucosamina ou galactosamina) que, na maioria das vezes, é sulfatado, e por um ácido urônico (glucurônico ou idurônico)¹⁵. A presença dos grupamentos carboxílicos no resíduo de ácido urônico e de quantidade variável de grupos sulfato por dissacarídeo faz com que essas substâncias apresentem alta densidade de cargas negativas. Estas cargas garantem a essas moléculas grande parte de suas características funcionais por se associarem a cátions livres e, com isso, reterem água nos tecidos. Além disso, permitem também a interação iônica com diversos componentes tais como proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento^{14,15,16,18,19}.

A composição dissacarídica e o tipo de ligação glicosídica entre eles, além do número e da localização dos radicais sulfatos, são levados em consideração na classificação dos glicosaminoglicanos ¹⁵.

Os principais glicosaminoglicanos ácidos encontrados nos tecidos animais são: condroitim 4 e 6 sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS), heparina (HEP), queratam sulfato (QS) e o ácido hialurônico ou hialuronam (AH). Estes compostos diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e de açúcar não aminado, quanto ao grau e a posição da sulfatação, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter e intra-dissacarídica.

As unidades estruturais dos diferentes glicosaminoglicanos estão apresentadas na Figura 1 e na Tabela 1. Essas são as unidades mais

freqüentemente encontradas. Entretanto, ocorrem variações no grau de sulfatação, nas proporções dos tipos de dissacarídeos constituintes e no tamanho molecular.

Com exceção do AH, todos os glicosaminoglicanos nos tecidos encontram-se ligados a uma cadeia protéica, formando os proteoglicanos ^{20,21}. O AH é constituído por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido D-glucurônico (GlcUA) e N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-3)$ e $\beta(1-4)$ intra e interdissacarídica, respectivamente. Sua densidade de carga negativa é conferida apenas pelos grupamentos carboxílicos, uma vez que, diferentemente dos outros glicosaminoglicanos, não apresenta sulfatação.

A alta complexidade dos proteoglicanos é demonstrada pelas diferenças que apresentam em suas estruturas, como tipo e número de cadeias de glicosaminoglicanos, além do tamanho e natureza da cadeia protéica ²². Estas diferenças contribuem para a sua distribuição e função no organismo. A classificação que normalmente é utilizada baseia-se na homologia do esqueleto protéico e na localização celular do proteoglicano, que pode ser subdividido em três grandes grupos: proteoglicanos de matriz extracelular, proteoglicanos de superfície celular e proteoglicanos intracelulares ou de grânulos.

Figura 1 - Unidades estruturais dos principais glicosaminoglicanos ²³.

Nomenclatura Meyer (1938)	Nomenclatura Jeanloz (1960)	P.M.	Monossacarídeos	Posição do sulfato	Ligação glicosídica
Condroitim sulfato A	Condroitim 4-sulfato	2.5×10^4	N-acetilgalactosamina	4	$\beta(1-4)$
			Ácido glucurônico	-	$\beta(1-3)$
Condroitim sulfato B	Dermatam sulfato	2.5×10^4	N-acetilgalactosamina	4	$\beta(1-4)$
			Ácido glucurônico	-	$\beta(1-3)$
			Ácido idurônico	-	$\alpha(1-3)$
Condroitim sulfato C	Condroitim 6-sulfato	2.7×10^4	N-acetilgalactosamina	6	$\beta(1-4)$
			Ácido glucurônico	-	$\beta(1-3)$
Ácido hialurônico	Ácido ^c hialurônico	$5-50 \times 10^5$	N-acetilglucosamina	-	$\beta(1-4)$
			Ácido glucurônico	-	$\beta(1-3)$
Querato sulfato	Queratam sulfato	$1-3 \times 10^4$	N-acetilglucosamina	6	$\beta(1-3)$
			galactose	-/6	$\beta(1-4)$
Heparitim sulfato	Heparam sulfato	$1-6 \times 10^4$	Glucosamina	2/6	$\alpha(1-4)$
			N-acetilglucosamina	-/6	$\alpha(1-4)$
			Ácido glucurônico	-	$\beta(1-4)$
			Ácido idurônico	-/2	$\alpha(1-4)$
Heparina	Heparina	$1-6 \times 10^4$	Glucosamina	2/6	$\alpha(1-4)$
			Ácido glucurônico	-	$\beta(1-4)$
			Ácido idurônico	-/2	$\alpha(1-4)$

Tabela 1 - Características estruturais dos glicosaminoglicanos ²⁴.

O ácido hialurônico possui três características fundamentais que o diferencia dos demais glicosaminoglicanos: não se associa covalentemente a uma proteína central, não é sulfatado e sua síntese ocorre por complexo enzimático (que se localiza na membrana plasmática) e à medida que é sintetizado ele é liberado para o meio extracelular ^{16,25,26}. Enquanto os outros GAGs são adicionados à proteína central e sofrem sulfatação no complexo de Golgi, o AH, à medida que é sintetizado, na membrana celular, é eliminado para fora da célula ^{16,25}. As enzimas que sintetizam o ácido hialurônico foram denominadas hialuronan sintases (hyaluronan synthases, HAS) são glicosiltransferases

localizadas na membrana plasmática as quais utilizam -N-acetyl-D-glucosamina e o D-glucuronato como substrato para síntese do ácido hialurônico na superfície celular e liberá-lo para o meio extracelular ²⁷.

Como o ácido hialurônico é o único GAG que não ocorre sob a forma de um proteoglicano, sua estrutura é bem simples. Sua arquitetura espiral polidispersa, estabilizada por pontes de hidrogênio, induz à formação de um gel altamente viscoso, que ocupa um volume de cerca de mil vezes maior do que a própria molécula. A capacidade de reter água, intumescer a matriz e formar gel, confere aos tecidos elevada resistência a forças compressivas ²⁵. Nas articulações, onde a compressão é constante, o ácido hialurônico é o componente mais abundante da matriz extracelular ²⁸. Por outro lado, a natureza frouxa, hidratada e porosa de uma matriz extracelular onde o AH predomina, é capaz de manter as células separadas umas das outras, permitindo que se movimentem e proliferem ²⁵.

A maioria das células sintetiza ácido hialurônico (AH) em algum estágio de sua vida ²⁵. O fígado é o principal sítio de liberação e degradação do ácido hialurônico circulante. Receptores de células endoteliais sinusoidais reconhecem o AH, levando à internalização e degradação do mesmo. A concentração desse GAG no soro resulta do balanço entre a síntese hepática e sua liberação. Assim, níveis séricos aumentados de AH são encontrados em pacientes com doenças hepáticas seguidas de fibrose e hipertensão portal ²⁹⁻³⁴.

O ácido hialurônico tem também papel importante no microambiente celular do câncer ³⁴. Células tumorais e normais exibem diversos sítios de ligação para este glicosaminoglicano, como a CD44 e a RHAMM (molécula de reconhecimento ao AH nos processos de migração-específica) em vários tipos celulares. Sua

adesão pode influenciar na mobilidade celular ³⁵. Ele também interage com outras proteínas da matriz extracelular, como o agrecam (proteoglicano de condroitim sulfato e de queratam sulfato), o versicam (proteoglicano de condroitim sulfato e de dermatam sulfato) ^{33,36} e com fatores de crescimento ³⁷.

O condroitim sulfato (CS) é um GAG policarboxissulfatado constituído por unidades dissacarídicas formadas de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-galactosamina, com ligação glicosídicas do tipo $\beta(1-3)$. Entre os dissacarídeos a ligação é do tipo $\beta(1-4)$. A sulfatação pode ocorrer nas posições C4 e C6 do resíduo aminado, levando às designações de condroitim-4-sulfato e condroitim-6-sulfato, respectivamente ³⁸. As estruturas desses compostos são híbridas, pois o condroitim-6-sulfato pode apresentar uma certa porcentagem de sulfatação na posição C4 e vice-versa ^{39,40}.

Os condroitins sulfatos são encontrados principalmente na matriz extracelular dos tecidos cartilagosos, representando cerca de 10% do peso seco desses tecidos ³⁸. O condroitim 4-sulfato ocorre com maior abundância nas cartilagens que se acham em estágio de crescimento e de ossificação ^{15,39,41,42}. O condroitim 4-sulfato é também registrado em alguns estados patológicos como artrose, calo ósseo, condromas e condrossarcomas ^{39,42}.

Por outro lado, a localização preferencial do condroitim 6-sulfato na matriz das cartilagens articulares ^{39,40,42} e na matriz extracelular da aorta de várias espécies animais ^{43,44} sugere que ele esteja envolvido com a manutenção da integridade dos tecidos sujeitos a altas pressões. Atua como inibidor de proteases extracelulares envolvidas no metabolismo do tecido conjuntivo, inibindo a produção de citocinas ^{45,46}.

O condroitim-6-sulfato na cartilagem reduz a apoptose, aumentando a atividade anabólica dos condrócitos, e limita a excessiva degradação da matriz extracelular, participando do controle da sua integridade. Apresenta ação anti-quimiotática e antiinflamatória, podendo agir como modulador estrutural, mantendo a integridade do espaço intercelular ⁴⁶. Foi também observado aumento de condroitim-6-sulfato em diversos tecidos neoplásicos ^{19,47-55}.

O dermatam-sulfato (DS) possui estrutura similar ao CS, diferindo deste pelo fato de apresentar, além de ácido glucurônico, ácido L-idurônico ligado a N-acetil D-galactosamina, sulfatada preferencialmente na posição C4 por meio de uma ligação $\beta(-3)$ e, mais raramente, na posição C6. Apresenta também sulfatação na posição C2 do ácido L-idurônico. O dermatam sulfato pode ser considerado um isômero do condroitim sulfato no qual uma proporção variável de ácido D-glucurônico é convertida, pela ação de uma epimerase, em ácido L-idurônico. As ligações entre os dissacarídeos são do tipo $\beta(1-4)$ ^{44,56-58}.

Apesar do DS estar presente em vários tecidos de vertebrados, sua função nos tecidos moles ainda não foi esclarecida. Por outro lado, presume-se que, nos tecidos conjuntivos densos como pele, córnea e tendão, estaria relacionado com a organização, a velocidade de deposição e à manutenção da malha de fibrilas de colágeno na cartilagem ^{14,59-61}.

Alguns autores sugerem ainda que o DS esteja envolvido com a fase de diferenciação, desenvolvimento, envelhecimento e reparo dos tecidos ^{60,62}. Sabe-se que o DS liga-se à atividade do fator de crescimento de queratinócitos (FGF-7) além de potencializá-lo. Este é produzido após injúria tecidual, induzindo a proliferação dos queratinócitos ⁶³.

O heparam sulfato (HS) é, provavelmente, o glicosaminoglicano de maior complexidade estrutural, podendo apresentar até quatro tipos diferentes de unidades dissacarídicas. É composto por unidades alternadas de ácido D-glucurônico e α -D-glucosamina unidos por ligação do tipo $\alpha(1-4)$ e, em menor proporção, resíduos de ácido L-idurônico ligado à glucosamina por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$. A glucosamina pode ser encontrada com elevado grau de N-acetilação (40-60%) e o restante, sob a forma N-sulfatada. A glucosamina pode também se apresentar na forma O-sulfatada na posição C6^{19,56,64-70}. É sintetizado *in vitro* por várias linhagens celulares e está associado à superfície da membrana celular^{13,48,49,71,72}. Sua ocorrência na superfície celular aliada à constatação de que sua estrutura é específica para diferentes tecidos e espécies são indícios de que este polímero funcione como molécula de reconhecimento celular^{18,49,65,73,74}.

Níveis aumentados de HS, bem como de colágeno e de fatores de crescimento encontrados na proliferação de tumores, sugerem sua atuação nos processos de reconhecimento e de adesão celular, como também seu papel no controle do crescimento e na angiogênese^{15,18,19,48,48,56,65,67,69,70,73,75}.

No presente trabalho procuramos identificar e quantificar os glicosaminoglicanos presentes no útero de ratas sob a ação de estrogênios e/ou progestagênios.

1.2. Revisão da Literatura

Na ausência de gravidez, o colo do útero tem como função secretar o muco que protege a cavidade desse órgão contra agentes patogênicos, além de possuir papel importante na ativação dos espermatozóides ⁷⁶. Alterações bioquímicas podem levar a distúrbios da fertilidade ⁷⁷. Já o corpo do útero é o local em que ocorre a implantação. É responsável também pela nutrição e proteção do embrião, com função bem definida e essencial para o sucesso da gravidez ^{77,78}. Durante o trabalho de parto, além das contrações uterinas, processam-se modificações bioquímicas, com alteração de prostaglandinas, óxido nítrico, matriz extracelular e ácido hialurônico, para permitir a dilatação do colo ^{17,78,80,81,82,83, 84}.

Vários trabalhos têm chamado a atenção para a relação existente entre a matriz extracelular, em especial os glicosaminoglicanos, e os tecidos tumorais, o sistema imune e a terapia hormonal ⁸⁵⁻⁸⁸. No entanto, no colo do útero os glicosaminoglicanos parecem estar relacionados ao parto ^{79,82,89,90,91,92}. Os eventos que controlam estas funções ainda não são totalmente conhecidos. Os proteoglicanos parecem atuar como sinalizadores químicos entre as células, pois, *in vitro*, ligam-se a várias moléculas sinalizadoras como os fatores de crescimento. Estudo de Afify et al. ⁷⁸ mostrou haver maior produção de ácido hialurônico no endométrio humano no período de implantação embrionária. Os proteoglicanos podem também influenciar a imunologia local uterina, durante e na ausência de gravidez ^{86,88,93}.

Poucos estudos relacionaram os glicosaminoglicanos no útero e a terapia hormonal. A maioria refere-se ao colo do útero na gravidez e no parto ^{17,76,80}.

O primeiro estudo que refere a presença de glicosaminoglicanos sulfatados no útero humano foi feito por Loewi e Consden ⁹⁴. Deve ser mencionado que, nessa ocasião, os glicosaminoglicanos eram denominados de mucopolissacarídeos ácidos.

Kofoed et al.⁹⁵ caracterizaram os glicosaminoglicanos no útero de ratas imaturas e identificaram a presença de ácido hialurônico, heparam sulfato, condroitim 4 e 6 - sulfato e dermatam sulfato. Dentre estes predominava o dermatam sulfato. Os estrogênios isolados aumentavam a concentração de glicosaminoglicanos, enquanto os progestagênios isoladamente não os alteravam, mesmo em altas dosagens. El Maradny et al.⁸⁰ assinalaram que o ácido hialurônico se encontra em concentrações muito baixas durante quase toda a prenhez, aumentando acentuadamente no final da mesma. Tal fato poderia estimular a produção de metaloproteinases bem como a migração e ativação leucocitária no colo do útero. Relataram ainda estar o ácido hialurônico relacionado, no colo do útero, à regulação do conteúdo de água e à atividade das enzimas collagenolíticas e citoquinas, o que facilitaria a dilatação cervical no momento do parto.

Takata e Terayama⁹⁶ analisando os glicosaminoglicanos no útero de ratas sob a ação de 17 beta - estradiol ou da progesterona, identificaram como seus maiores componentes condroitim 4 ou 6 sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato e ácido hialurônico. Quando os animais foram tratados com 17 β -estradiol encontraram, de maneira geral, maior concentração de glicosaminoglicanos, com aumento mais acentuado de condroitim 4 ou 6 sulfato em relação ao dermatam sulfato.

Golichowski et al.⁹⁷ notaram, no colo do útero de ratas, aumento de 6% dos glicosaminoglicanos (ciclo estral) para 33% no final da prenhez. Detectaram ainda a presença de dermatam sulfato, ácido hialurônico e heparam sulfato. Destes, o ácido hialurônico aumentou 17 vezes ao término da prenhez. Referem também que essas mudanças poderiam estar associadas ao acúmulo deste glicosaminoglicano entre as fibras colágenas, o que determinaria o amolecimento desse tecido.

Cidadão et al.⁹⁸ estudaram, por intermédio de citoquímica, a localização dos glicosaminoglicanos no útero de ratas e camundongas sob ação do estrogênio e da progesterona. Relatam que os glicosaminoglicanos localizam-se de preferência no endométrio, em especial nas lâminas basais e entre os feixes de colágeno. A administração conjunta de estrógeno e de progesterona aumenta

a concentração dos glicosaminoglicanos, os quais devem estar envolvidos no processo de implantação.

Gomes et al.^{99,100} realizaram estudos para localizar e determinar a concentração de glicosaminoglicanos no corno do útero de camundongas durante as diferentes fases do ciclo estral. Observaram que a concentração de glicosaminoglicanos sulfatados e carboxilados acha-se na dependência dos níveis hormonais, com maior produção de dermatam e condroitim sulfato na fase de estro e a do ácido hialurônico na de diestro. Estas substâncias encontram-se principalmente no endométrio e estão localizadas entre as fibras de colágeno, na membrana basal e ao redor dos fibroblastos.

Cubas et al.¹⁰¹ idealizaram estudo para determinar a concentração de glicosaminoglicanos no colo do útero de ratas durante o ciclo estral. Identificaram a presença de dermatam sulfato, heparam sulfato e ácido hialurônico, observando que o primeiro se encontrava em maior concentração em todas as fases do ciclo estral, estando significativamente aumentado na fase de estro. O heparam sulfato achava-se aumentado na fase de proestro.

Myers et al.¹⁷ compararam a concentração de glicosaminoglicanos no colo do útero de mulheres no ciclo menstrual e na gravidez e referem haver um aumento acentuado no conteúdo destes, em especial do ácido hialurônico, na gravidez.

Pelo que se depreende da literatura, existem alterações nas concentrações dos glicosaminoglicanos no colo e no corpo do útero relacionadas às variações hormonais que seriam importantes na implantação, no mecanismo de dilatação cervical durante o parto e também na carcinogênese^{79,80,82,87,90,91,92,102,103,104}. Apesar das evidências quanto à possível ação dos esteróides sexuais sobre os glicosaminoglicanos, os conhecimentos sobre o perfil, a quantidade e sua distribuição no útero ainda são pouco estudados com relação à reposição hormonal. Assim, propusemo-nos realizar o presente estudo com o objetivo de avaliar o perfil dos glicosaminoglicanos presentes no útero de ratas adultas ooforectomizadas sob a ação de estrogênios isolados ou associados aos progestagênios.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o perfil de glicosaminoglicanos presentes no útero de ratas adultas ooforectomizadas sob a ação de estrogênios conjugados isolados ou associados à medroxiprogesterona.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar e quantificar os glicosaminoglicanos ácidos (heparam, dermatam e condroitim sulfatos) presentes no corno e no colo do útero de ratas ooforectomizadas sob a ação de estrogênios conjugados isolados e/ou associados à medroxiprogesterona.
- Quantificar o ácido hialurônico presente no corno e no colo do útero de ratas ooforectomizadas sob a ação de estrogênios conjugados isolados e/ou associados à medroxiprogesterona.

3. Material e Métodos

3.1. Material

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia Mammalia) da Colônia OUTB EPM-1-Wistar, adultas (± 3 meses), virgens, com peso aproximado de 250 gramas, oriundas do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM) e manipuladas de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação ¹⁰⁵. Antes do início do experimento, o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) sob o número 0223/09.

Os animais foram realocados no Biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP-EPM, sendo confinados 5 em cada gaiola de plástico com tampa gradeada de metal, com dimensões de 45 x 35 x 15 cm de comprimento, largura e altura, respectivamente. Todos foram mantidos no biotério sob fotoperíodo claro de 12 horas intercalado com escuro de 12 horas e temperatura controlada (22 °C). O período claro foi considerado das 7 horas às 19 horas, sendo usada uma iluminação artificial produzida por lâmpadas fluorescentes marca Phillips (modelo luz do dia de 40 Watts), desde o início até o término do experimento. A alimentação constituiu-se de ração padrão (Labina-Purina, São Paulo, Brasil) e água "*ad libitum*".

Após uma semana de adaptação ao novo ambiente, todos os animais foram submetidos a exames colpocitológicos (às 8 horas), por 14 dias consecutivos, para avaliação do ciclo estral. A secreção vaginal foi obtida através de hastes de algodão, umedecidas com solução salina (cloreto de sódio a 0,9%). O conteúdo foi transferido para lâminas histológicas, fixado em solução de álcool-éter (1:1) e corado pelo Método de Harris-Shorr ¹⁰⁶.

Posteriormente, as lâminas foram submetidas à análise em microscópio de luz. Somente as ratas com ciclos estrais regulares (proestro, estro, metaestro e diestro), ou seja, que apresentavam atividade ovariana satisfatória, foram incluídas no estudo ¹⁰⁷.

Assim, trinta dias após a ooforectomia bilateral, 40 ratas foram divididas em quatro grupos, contendo cada um 10 animais, a saber:

Grupo I - propilenoglicol, 0,5 mL/animal por dia;

Grupo II - estrogênios conjugados eqüinos (ECE), na dose de 50 µg/Kg por dia ^{108,109};

Grupo III - acetato de medroxiprogesterona (AMP), na dose de 0,2 mg/Kg por dia ^{108,109,110};

Grupo IV - estrogênios conjugados eqüinos (ECE), na dose de 50 µg/Kg por dia, associados ao acetato de medroxiprogesterona (AMP), na dose de 0,2 mg/Kg por dia ^{108,109,111,112}.

Os fármacos foram administrados por gavagem, durante 28 dias consecutivos, diluídos em 0,5 mL de propilenoglicol para uniformizar o volume ofertado.

3.2. Métodos

3.2.1. Ooforectomia

Para realização da ooforectomia, foi feita anestesia dissociativa utilizando cloridrato de xilazina (Rompum® - 16 mg/Kg) e cloridrato de quetamina (Ketalar® - 60 mg/Kg) por via intraperitoneal. Em seguida as ratas foram posicionadas decúbito-ventralmente e, após tricotomia, fez-se incisão de aproximadamente 3,5 cm de comprimento na pele da região ventral. Com o auxílio de uma pinça, foram exteriorizados os ovários e as pontas dos cornos uterinos com a gordura adjacente. Após identificar-se os ovários, efetuou-se a ligadura dos vasos

ovarianos com fio de seda preta (6,0 Ethicon - Johnson & Johnson), os quais foram imediatamente seccionados e retirados. Em seguida, os demais tecidos foram cuidadosamente reintroduzidos na cavidade peritoneal após a certificação de estancamento do sangramento. A cavidade peritoneal foi fechada em dois planos (muscular – pontos contínuos; cutâneo - pontos separados) com fio de seda preta 6,0 (Ethicon - Johnson & Johnson). Ao final, a pele foi limpa com álcool iodado.

Após 15 dias da cirurgia, foram novamente realizados esfregaços vaginais diários para determinação do hipoestrogenismo por um período de uma semana. Somente os animais que apresentaram esfregaços com padrão atrófico foram incluídos no experimento.

3.2.2. Coleta e processamento do material

Após 24 horas da última tomada dos fármacos, os animais foram anestesiados com mistura de xilazina (16 mg/Kg) e quetamina (60 mg/Kg), por via intraperitoneal. Por incisão longitudinal do abdome, foram retirados os úteros (Fig. 2). Estes foram imediatamente mergulhados em acetona e, em seguida, separou-se o colo dos cornos uterinos. Nestes últimos, isolaram-se os terços médios. Os animais foram eutanasiados logo em seguida, por aprofundamento do plano anestésico.

Figura 2 – Esquema mostrando porção do trato genital da rata, onde se observa parte da vagina, o colo e parte dos cornos uterinos.

3.2.3. Extração e determinação dos glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs)

Os fragmentos uterinos (colo e corno do útero) de cada animal, após 24 horas de imersão em acetona, foram triturados e secos em estufa regulada à temperatura de 40 °C a 50 °C, por um período de 3 a 4 horas. O pó cetônico obtido após a secagem foi incubado com papaína (2,0 mg/mL em tampão fosfato-cisteína, pH 6,5 na proporção de 5 mL/g de pó cetônico) por 18 horas, a 60 °C. Após a incubação, o material foi centrifugado (5000 G por 15 minutos). A seguir, o precipitado foi descartado e, ao sobrenadante, acrescentou-se NaCl para uma concentração de 1 M; ácido tricloroacético também foi adicionado até a concentração final de 10%, sempre em banho de gelo e sob agitação constante. Os sobrenadantes, após centrifugação (44 G por 10 minutos), foram precipitados com dois volumes de metanol e mantidos a -20 °C, durante 18 horas. Os precipitados alcoólicos (secos a vácuo) foram suspensos em 100 µL de solução tampão, acetato de sódio 50 mM, em pH 6,0, contendo desoxirribonucleases e incubados a 30 °C por 12 horas. Os glicosaminoglicanos foram então analisados.

3.2.4. Eletroforese em gel de agarose

Através da eletroforese em gel de agarose, foram identificados e quantificados os glicosaminoglicanos sulfatados. Utilizou-se o método desenvolvido por Jaques et al.¹¹³ e modificado por Dietrich e Dietrich⁶⁴. Deve ser salientado que este método permite detectar até 0,015 µg de GAG por mg de extrato cetônico.

A técnica consiste na aplicação de 5 µg do composto em gel agarose 0,55%, em tampão 1,3 diaminopropano acetato 0,05 M, pH 9,0, com espessura de dois mm. A corrida eletroforética foi realizada em uma câmara refrigerada, submetida a uma diferença de potencial elétrico de 100 V, durante aproximadamente 1 hora ou até que se teve a migração apropriada.

Após a corrida, os glicosaminoglicanos foram precipitados no gel com CETAVLON (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1%, por um período mínimo de 2 horas. Após secagem sob calor e ventilação, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em etanol 50 °GL e ácido acético a 1%.

A identificação do tipo de glicosaminoglicano foi feita comparando-se a migração eletroforética das amostras à de padrões conhecidos e purificados. Estes mesmos padrões foram utilizados para a determinação dos compostos através de densitometria a 525 nm.

Foram utilizados padrões de heparam sulfato (purificado de pâncreas bovino como descrito por Dietrich et al.¹², condroitim 4 - sulfato (cartilagem de baleia) e dermatam sulfato (pele de porco), adquiridos da empresa Seikagaku Kogyo Co. (Tóquio, Japão).

Os resultados foram expressos em µg de GAGs por mg de extrato cetônico (media ± DPM).

3.2.5. Quantificação do ácido hialurônico

O método utilizado foi desenvolvido no Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Trata-se de método fluorométrico para a determinação do ácido hialurônico em fluídos biológicos, utilizando para tal sondas de ligação ao ácido hialurônico³³. A sonda é isolada de cartilagem nasal bovina e é constituída da região globular do agregam (um proteoglicano formado por um esqueleto protéico ao qual se ligam cadeias de queratam sulfato e condroitim sulfato) e pela proteína de ligação do ácido hialurônico. A sonda é usada imobilizada em placas de ELISA, à semelhança de um anticorpo de captura, como sonda biotinilada, funcionando nesse último caso como um anticorpo secundário marcado (Fig. 3).

Figura 3 – Esquema do método fluorométrico ³³.

3.2.6. Quantificação do ácido hialurônico pelo método fluorométrico ELISA-like

O ácido hialurônico foi quantificado a partir de amostras do pó cetônico obtidas para a determinação dos glicosaminoglicanos. Este procedimento consta, inicialmente, de adicionar 100 µL de uma solução de proteína de ligação (proteína de ligação do ácido hialurônico obtida a partir de cartilagem bovina) diluída em tampão Na_2CO_3 0,06M, pH 9,6 em cada poço da placa de ELISA mantida *overnight* à temperatura de 4 °C. A solução é removida e a placa lavada com Tris-HCl 0,05M, pH 7,75 (tampão de lavagem). Os sítios inespecíficos são bloqueados acrescentando-se 200 µL em cada poço de uma solução Tris-HCl 0,05M, pH 7,75 e soro albumina bovina (BSA) 1% por 1 hora a 37 °C e mantidas a 4 °C nesta solução até o momento das dosagens.

Também foram preparadas placas recobertas com ácido hialurônico (50 µg/mL) ou BSA 1% nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.2.7. Ensaio tipo sanduíche do ácido hialurônico

À placa coberta com proteína de ligação foram adicionadas 100 µL por poço de soluções de ácido hialurônico padrão em várias concentrações diluídas no tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,75 e BSA 1% (tampão de ensaio) além das soluções amostras obtidas dos tecidos após proteólise em triplicatas. Seguiu-se uma incubação a 4 °C, *overnight*, sendo a placa tratada em seguida com tampão de lavagem.

A seguir, adicionaram-se 100 µL da sonda do ácido hialurônico (proteína de ligação extraída da cartilagem bovina biotinizada – 1 mg/mL) diluída 1:5 000 ou 1:10 000 no tampão de ensaio. A placa foi agitada por 2 horas e, em seguida, lavada com o tampão de lavagem.

Após a lavagem, foram adicionados à placa 100 µL por poço de estreptavidina, marcada com Európio (Delfia Eu-labelling kit), diluída em 1:10 000 em tampão de ensaio. Agitou-se por uma hora e, a seguir, foi tratada pelo tampão de lavagem. Por fim, adicionou-se solução de realçe (200 µL por poço), agitou-se por 5 minutos e a placa foi lida em fluorímetro. As amostras foram analisadas em triplicata e as placas lidas em fluorímetro Wallac 2-Victor Multilabell Counter (Pearkin Elmer Life Sciences). Este método permite detectar até 0,2 µg de ácido hialurônico por mg³³.

3.3. Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi baseado nos dados obtidos na quantificação dos glicosaminoglicanos (médias e desvios-padrão). Para tanto, o intervalo de confiança para este estudo foi fixado em 95%, com erro de 5%.

Aplicou-se a seguinte fórmula: $N = (Z^2 \cdot S^2) / d^2$, onde N = tamanho da amostra; Z = número de desvios-padrão, que no caso de uma distribuição normal é de 1,96; S = desvios-padrão das médias e d = diferença das médias ¹¹⁴. Em nosso estudo, o número mínimo de animais por grupo foi quatro.

3.4. Método Estatístico

Para a análise dos resultados utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA). Quando houve significância, foi complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. O teste *t* de *Student* pareado foi aplicado para comparar os glicosaminoglicanos do colo e do corno uterino no mesmo grupo. Fixou-se *p* menor que 5% ($p \leq 0,05$).

4. Resultados

Nossos resultados mostraram a presença de dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS) e ácido hialurônico nos colos e nos cornos uterinos em todos os animais pertencentes aos vários grupos do experimento, como pode ser visto nas figuras 4 e 5 e nas tabelas 2 e 3. No entanto, não detectamos a presença de condroitim sulfato (CS).

Analisando os dados referentes às concentrações de glicosaminoglicanos sulfatados totais no colo e no corpo do útero, percebemos que existem diferenças quantitativas nessas duas porções (Fig. 6). Notamos haver maior concentração dos glicosaminoglicanos sulfatados no colo em relação ao corno uterino. Já no que se refere ao ácido hialurônico, encontramos maior concentração no corno uterino (Tabelas 2, 3 e Fig. 6).

Com relação ao colo uterino, notamos aumento significativo na concentração de glicosaminoglicanos sulfatados em todos os grupos tratados com esteróides, o qual foi maior no grupo tratado com estrogênios conjugados eqüinos associados ao acetato de medroxiprogesterona (GIV) ($6,33 \pm 0,30^*$ mg/g, $p < 0,01$). Já no corno uterino, o uso de acetato de medroxiprogesterona não elevou significativamente o nível de glicosaminoglicanos totais. Entretanto, a administração de estrogênios conjugados eqüinos isolados ou associados ao acetato de medroxiprogesterona induziu a aumento na sua concentração (GII = $3,97 \pm 0,41^*$ mg/g; $p < 0,01$).

Com relação aos tipos de glicosaminoglicanos sulfatados presentes nas duas partes do útero (colo e corno), houve respostas diferentes em relação ao estímulo hormonal por nós induzido.

Na migração eletroforética dos glicosaminoglicanos, registramos alterações no padrão de migração do dermatam sulfato, que apresentou migração intermediária entre o dermatam e o condroitim sulfato, em especial no grupo tratado com estrogênios conjugados eqüinos, indicando a presença de novos

compostos sulfatados. O dermatam sulfato encontrou-se aumentado no colo uterino em todos os grupos tratados com hormônio, sendo maior no recebeu estrogênios conjugados eqüinos associados ao acetato de medroxiprogesterona ($6,14 \pm 0,27$; $p < 0,01$). Já no corno uterino notamos que o acetato de medroxiprogesterona isolado não alterou a sua concentração ($1,81 \pm 0,10$ mg/g). No entanto, quando administrado conjuntamente aos estrogênios conjugados eqüinos, induziu ligeira inibição em sua formação ($2,62 \pm 0,27^*$ mg/g, $p < 0,01$).

O heparam sulfato no colo uterino mostrou-se aumentado em todos os grupos tratados com hormônios, sendo que o acetato de medroxiprogesterona mostrou ter ação positiva na produção desse glicosaminoglicano (GIII = $0,18 \pm 0,03$ mg/g e GIV $0,20 \pm 0,02$ mg/g em relação aos grupos GI e GII, $*p < 0,01$). Já nos cornos uterinos a administração do acetato de medroxiprogesterona reduziu a concentração desse glicosaminoglicano (GIV = $0,22 \pm 0,02^*$ mg/g, $p < 0,01$). Quando foram comparadas as concentrações de heparam sulfato nas duas porções do útero, houve maior concentração no corno uterino.

No que diz respeito à concentração de ácido hialurônico, este se encontra numa concentração 100 vezes menor do que os glicosaminoglicanos sulfatados. Encontramos maior concentração desse glicosaminoglicano carboxilado nos cornos uterinos em relação aos colos, com exceção do grupo III (administração da medroxiprogesterona). No entanto, não encontramos diferenças na concentração desse glicosaminoglicano sob estímulo hormonal nos colos e nos cornos uterinos.

Figura 4 – Comportamento eletroforético dos glicosaminoglicanos sulfatados presentes nos colos dos úteros de ratas pertencentes aos vários grupos. CS – condroitim sulfato, DS – Dermatan sulfato, HS heparam sulfato. Or – origem da corrida eletroforética; P = padrão; + = pólo positivo e – pólo negativo. (G) = grupo. GI = ooforectomizado; GII = estrogênios conjugados eqüinos; GIII = acetato de medroxiprogesterona; GIV = estrogênios conjugados eqüinos + acetato de medroxiprogesterona

Figura 5 – Comportamento eletroforético dos glicosaminoglicanos sulfatados presentes nos cornos uterinos de ratas pertencentes aos vários grupos (G) de estudo. CS – condroitim sulfato, DS – Dermatan sulfato, HS - heparan sulfato. Or – origem da corrida eletroforética; P = padrão; + = pólo positivo e – pólo negativo. GI = ooforectomizado; GII = estrogênios conjugados eqüinos; GIII = acetato de medroxiprogesterona; GIV = estrogênios conjugados eqüinos + acetato de medroxiprogesterona

Tabela 2 - Análise quantitativa dos glicosaminoglicanos no colo uterino de ratas em diferentes condições hormonais. Não foi detectada presença de condroitim sulfato em nenhuma das amostras. Os dados são média $\pm$ EPM de determinações em duplicata. () = número de animais

Dosagem	Grupos			
	GI (7)	GII (9)	GIII (7)	GIV (10)
Glicosaminoglicanos sulfatados (mg/g)	2,64 $\pm$ 0,29	5,02 $\pm$ 0,51 ^{a*}	4,79 $\pm$ 0,33 ^{a*}	6,33 $\pm$ 0,30 ^{b**}
Dermatam sulfato (mg/g)	2,60 $\pm$ 0,29	4,88 $\pm$ 0,49 ^{a*}	4,61 $\pm$ 0,32 ^{a*}	6,14 $\pm$ 0,27 ^{b**}
Heparam sulfato (mg/g)	0,05 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,01 ^{a*}	0,18 $\pm$ 0,03 ^{b**}	0,20 $\pm$ 0,02 ^{b**}
Ácido hialurônico (μ g/g)	7,44 $\pm$ 2,98	8,16 $\pm$ 2,53	10,01 $\pm$ 3,03	10,92 $\pm$ 3,52

Legendas: ratas adultas ooforectomizadas e tratadas como segue: GI = ooforectomizadas; GII = tratadas com estrógenos conjugados equinos; GIII = tratadas com medroxiprogesterona; GIV = tratadas com ambos. As letras sobrescritas indicam comparações entre os valores indicados (a $\neq$ b, $P < 0,05$). Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo GI (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Tabela 3 - Análise quantitativa dos glicosaminoglicanos no corno uterino de ratas em diferentes condições hormonais. Não foi detectada presença de condroitim sulfato em nenhuma das amostras. Os dados são média $\pm$ EPM de determinações em duplicata. () = número de animais

Dosagem	Grupos			
	GI (7)	GII (9)	GIII (7)	GIV (10)
Glicosaminoglicanos sulfatados (mg/g)	1,96 $\pm$ 0,07	3,97 $\pm$ 0,41 ^{b**}	2,03 $\pm$ 0,11	2,92 $\pm$ 0,29 ^{a*}
Dermatam sulfato (mg/g)	1,65 $\pm$ 0,06	3,56 $\pm$ 0,39 ^{b*}	1,81 $\pm$ 0,10	2,62 $\pm$ 0,27 ^{a*}
Heparam sulfato (mg/g)	0,31 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,02 [*]	0,29 $\pm$ 0,04
Ácido hialurônico (μ g/g)	15,19 $\pm$ 2,91	20,50 $\pm$ 3,47	14,17 $\pm$ 2,86	24,95 $\pm$ 4,82

Legendas: ratas adultas ooforectomizadas (OVx) e tratadas como segue: GI = ooforectomizadas; GII = tratadas com estrógenos conjugados equinos; GIII = tratadas com medroxiprogesterona; GIII = tratadas com ambos. As letras sobrescritas indicam comparações entre os valores indicados (a $\neq$ b, $p < 0,05$). Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo GI (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Figura 6 – Gráficos mostrando a concentração dos glicosaminoglicanos obtidos nos colos e nos cornos uterinos de ratas ooforectomizadas (GI), tratadas durante 28 dias com estrogênios conjugados eqüinos (GII), tratadas com acetato de medroxiprogesterona (GIII) ou estrogênios conjugados eqüinos + acetato de medroxiprogesterona (GIV). (GAGs = glicosaminoglicanos sulfatados totais). (Teste *t* de *Student* pareado, **p* < 0,05; ***p* < 0,01)

5. Discussão

Os glicosaminoglicanos formam a matriz extracelular e aparecem distribuídos na escala filogenética desde espongiários até os mamíferos superiores, estando presentes em todos os filos que apresentam organização tissular^{12,65,115}.

Em nosso material, detectamos a presença de ácido hialurônico, heparam sulfato e dermatam sulfato no colo e no corno uterino de ratas em todos os grupos estudados. No entanto, não registramos a presença do condroitim 4 ou 6 sulfato. Esse fato poderia estar relacionado ao longo tempo de castração dos animais, uma vez que estes dois últimos glicosaminoglicanos foram identificados no útero de ratas imaturas tratadas com estrogênios imediatamente após a castração por Kofoed et al.⁹⁵. Reforçando a ocorrência destes glicosaminoglicanos no útero, Cidadão et al.⁹⁸ identificaram a presença de condroitim 4 ou 6 sulfato em ratas pré-púberes, com baixos níveis de estrogênios. Nossos dados mostraram que esses dois tipos de glicosaminoglicanos não reaparecem após 60 dias de castração mesmo após a administração de estrogênios, ou seja, após longo período de hipoestrogenismo.

Há inúmeros fatores que podem influenciar o metabolismo dos glicosaminoglicanos na matriz extracelular como, por exemplo, o processo de envelhecimento que exerce mudanças qualitativas e quantitativas nessas macromoléculas. Este fato foi muito bem estudado por Weinstein et al.¹¹⁶ que verificaram haver alterações no padrão de glicosaminoglicanos no tecido conjuntivo de ratos com o evoluir da idade, ou seja, observaram queda progressiva na síntese de ácido hialurônico e pronunciada redução nos níveis de dermatam sulfato, condroitim 4 e 6 sulfato e do heparam sulfato. Este poderia ser outro mecanismo que justificaria a não detecção de condroitim 4 e 6 sulfato em nosso estudo.

Em nosso material notamos que a concentração total de glicosaminoglicanos se mostrou maior no colo do que nos cornos uterinos, tanto

nos valores basais (controles) quanto em resposta à administração dos esteróides sexuais (estrogênios conjugados eqüinos e/ou acetato de medroxiprogesterona). Entretanto, nos cornos uterinos registramos maiores quantidades de heparam sulfato e de ácido hialurônico do que no colo uterino. Estes dados reforçam o fato de que, além das diferenças morfológicas, existem também diferenças bioquímicas entre essas duas porções do útero frente à ação hormonal. Isso explicaria as diferenças funcionais destas duas áreas em resposta aos hormônios sexuais no decorrer do ciclo menstrual, durante a gravidez e também por ocasião do parto.

Nos animais que receberam reposição hormonal, em especial os estrogênios, observamos aumento dos glicosaminoglicanos sulfatados, tanto no colo quanto nos cornos uterinos. Estes dados são similares aos encontrados por Kofoed et al.⁹⁵ que notaram que os estrogênios induzem o aumento dos glicosaminoglicanos, enquanto a progesterona isoladamente não alteraria esses níveis. Em nosso estudo percebemos que a progesterona, quando administrada conjuntamente aos estrogênios, promove a inibição da produção dos glicosaminoglicanos no útero. Deve ser mencionado que Kofoed et al.¹¹⁷, em trabalho onde utilizou o útero como controle, referem que a administração de acetoxiprogesterona causou a diminuição na concentração dos glicosaminoglicanos nesse órgão.

Dentre os glicosaminoglicanos sulfatados, deve-se destacar o dermatam sulfato, que aumentou tanto com a reposição dos estrogênios quanto com a medroxiprogesterona no colo uterino. Notou-se ainda haver um efeito aditivo no colo uterino da progesterona ao efeito dos estrogênios quando os dois hormônios foram administrados conjuntamente. Entretanto, isto não ocorreu nos cornos uterinos; apenas os estrogênios mostraram ter ação positiva sobre esse glicosaminoglicano, sendo esta ação bloqueada após a administração da medroxiprogesterona. Estes dados sugerem haver comportamento distinto do dermatam sulfato no colo e no corpo do útero da rata. Este fato explica, em parte, os fatos que envolvem o mecanismo da gravidez e da parturição, visto que esse glicosaminoglicano está relacionado à estruturação das fibrilas do colágeno tipo I^{118, 119}. Durante a gravidez, esse glicosaminoglicano é importante para manter a

integridade estrutural do colo uterino, no entanto, no corpo do útero o tecido conjuntivo, deve ser mais frouxo para que o conceito possa receber aporte sanguíneo adequado^{120, 121}.

Ainda em relação ao dermatam sulfato, em alguns tecidos apresenta propriedades farmacológicas particulares, entre as quais se destacam as atividades trombocitopênicas, redução da formação óssea e anti-apoptótica^{122,123,124}.

Nossos resultados mostraram alterações no padrão de migração do dermatam sulfato tanto no colo quanto no corno uterino, em especial no grupo tratado com estrogênios conjugados eqüinos, indicando a presença de novos compostos sulfatados. Estudos referem que compostos com este padrão de migração podem estar envolvidos na carcinogênese¹²⁵. Nossos dados mostraram que a medroxiprogesterona atenuou o efeito dos estrogênios em relação ao padrão de migração. Talvez alguns glicosaminoglicanos sulfatados possam estar envolvidos na gênese do carcinoma endometrial visto que a progressão das lesões hiperplásicas precursoras dessa neoplasia estrogênio-dependente são bloqueadas pela progesterona^{126,127}. Este fato poderia sugerir que os progestagênios seriam necessários para prevenir o aumento desse tipo de glicosaminoglicano. Na prática ginecológica, este dado reforçaria ainda mais o uso de progestagênios na reposição hormonal na mulher pós - menopáusica com útero.

Com relação à análise da concentração do ácido hialurônico no útero de ratas, o que nos chamou inicialmente a atenção foi o fato de estar em baixas concentrações quando comparado aos glicosaminoglicanos sulfatados. Acreditamos que este fato decorra de encontrar-se hidratado nos tecidos, pois seu volume pode aumentar cerca de mil vezes. Nossos resultados revelaram não haver diferenças, na sua concentração, significantes no colo e no corpo do útero devidas à ação dos esteróides sexuais. No entanto, a sua concentração foi maior nos cornos do que nos colos uterinos.

O ácido hialurônico não é produzido no aparelho de Golgi, como ocorre com os outros glicosaminoglicanos, mas sim na superfície citoplasmática

da membrana celular ²⁶. Inúmeras enzimas denominadas hialuronan sintases (HAS) estão relacionadas à sua síntese. Conhecem-se pelo menos três isoformas, designadas pelas siglas HAS1, HAS2 e HAS3 que são codificadas em diferentes cromossomos ^{128,129}. Estas enzimas foram identificadas tanto em humanos como em roedores e possuem de 55 a 71% de similaridade na seqüência de seus aminoácidos ¹³⁰. Heldin et al. ¹²⁹ mostraram que cada uma das três isoformas da HAS teria a capacidade de polimerizar diferentemente o ácido hialurônico, formando cadeias de vários tamanhos. Devido ao seu enorme tamanho, este é transportado para fora da célula assim que vai ocorrendo a sua síntese.

É documentado na literatura que o ácido hialurônico desempenha várias funções tais como estimular a produção de IL-8, IL-1 e fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) ¹³⁰; reparação tecidual, efeito antiinflamatório e imunossupressão ^{131, 132}; angiogênese ^{133, 134, 135, 136}; manutenção da integridade do epitélio e regeneração ¹³⁰. No campo da reprodução estaria envolvido com a ovulação, implantação, embriogênese e parto ^{133, 137}. Este glicosaminoglicano estaria envolvido com essas inúmeras funções em virtude do tamanho de sua cadeia. Isto pode ocorrer durante a síntese ou a sua degradação. Stern et al. ¹³⁸ referem que não se conhece ainda como as células produzem esses fragmentos, no entanto, dependendo do tamanho, estariam relacionados com à sinalização de várias vias metabólicas.

Uchiyama et al. ¹³⁹ estudaram a expressão e a regulação do RNA mensageiro das três isoformas da HAS em fibroblastos oriundos do colo uterino de camundongas sob a influência da progesterona e do estrogênio. Notaram que a expressão do RNA mensageiro da HAS1 e HAS2 foi inibida pela progesterona, sendo dose-dependente. Em contraste, a progesterona determinou a elevação da expressão da HAS3. Já o estrogênio não influenciou na expressão do RNA mensageiro de nenhum dos tipos da HAS.

Sabe-se que durante a gestação há mudanças das proteínas da matriz extracelular no colo uterino, em especial do colágeno, conforme a elevação dos níveis de progesterona e de estrogênios, que são importantes para a manutenção da gravidez e o amadurecimento do colo no seu final, havendo

incremento do AH ^{137, 140}. Inúmeros pesquisadores acreditam que os diferentes polímeros do AH são essenciais para a retenção hídrica no decorrer da gravidez e, ao final da gestação, são importantes para o desencadeamento da parturição^{81, 141, 142}.

O acúmulo de AH na matriz extracelular pode participar no amolecimento e do edema do colo uterino devido às suas propriedades de elasticidade e de afinidade pela água ¹⁴³. Assim, tanto o aumento como o aparecimento de polímeros do AH apresentam papel essencial na remodelação da matriz extracelular no processo de amadurecimento do colo uterino ¹⁴⁴. Por isto mesmo, acreditamos que o AH tem participação na cérvix uterina e estaria sob a influência dos esteróides sexuais.

Portanto, embasados nos resultados das dosagens dos glicosaminoglicanos no colo e no corpo do útero de ratas ooforectomizadas, notamos que os estrogênios conjugados eqüinos associados ou não ao acetato de medroxiprogesterona apresentaram, de maneira geral, efeito trófico. Além disto, o tratamento com estrogênios conjugados eqüinos induz a mudanças no comportamento eletroforético do dermatam sulfato, sugerindo haver novos compostos, visto terem migração intermediária entre o dermatam e o condroitim sulfato. Ademais, as ratas tratadas simultaneamente com estrogênios conjugados eqüinos e acetato de medroxiprogesterona não exibiram essa mudança no comportamento eletroforético. Essas diferenças sugerem haver, com a estrogênioterapia, mudanças na estrutura desses glicosaminoglicanos. Tais resultados deixam entrever um possível papel dos estrogênios na carcinogênese uterina, que seria bloqueada pelos progestagênios.

6. Conclusões

Os ensaios qualitativos e quantitativos realizados no colo e cornos uterinos de ratas adultas ooforectomizadas e posteriormente tratadas com estrogênios conjugados eqüinos isolados ou associados ao acetato de medroxiprogesterona, revelaram:

1. Tanto o colo como o corno uterino apresentam glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados (dermatam sulfato e heparam sulfato) e carboxilados (ácido hialurônico). Em ambas porções uterinas, o dermatam sulfato foi predominante em relação aos outros GAGs;
2. Os estrogênios conjugados equinos mostraram ter ação positiva sobre os níveis de dermatam sulfato presentes tanto no colo como no corno uterino. Em contraste, a medroxiprogesterona teve ação negativa sobre este GAG no corno uterino;
3. O corno é mais rico em heparam sulfato do que o colo uterino. Nesta região, os estrogênios conjugados e a medroxiprogesterona exerceram ação trófica. Por outro lado, no corno uterino somente a medroxiprogesterona mostrou esse efeito;
4. O ácido hialurônico apareceu em maior concentração no corno do que no colo uterino e sua concentração não se modificou sob a ação dos estrogênios ou da medroxiprogesterona.

7. Anexo

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 01/04/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0223/09**, intitulado: "**PERFIL DOS GLICOSAMINOGLICANOS NO ÚTERO DE RATAS OOFORECTOMIZADAS E TRATADAS COM ESTROGÊNIO E/OU PROGESTAGÊNIO**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Edmund Chada Baracat**

Pesquisador (a) Executante: **Ricardo dos Santos Simões**

CAPPesq, 02 de Abril de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

8. Referências

- 1 Rozenbaum H, Birkhauser M, De Nooyer C. Comparison of two estradiol transdermal systems (Oesclim[®] 50, Estraderm TTS[®] 50) I. Tolerability, adhesion and efficacy. *Maturitas* 1996; 25:161–73.
- 2 Patriarca MT, Goldman KZ, Santos JM, Petri V, Simões RS, Soares JM Jr, et al. Effects of topical estradiol on the facial skin collagen of postmenopausal women under oral hormone therapy: a pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 130:202-5.
- 3 Vieira LHL, Soares Jr JM, Nunes MG, Simões RS, Cristina Kaari C, Haidar MA, et al. Efeitos da isoflavona e dos estrogênios conjugados eqüinos sobre a qualidade de vida na pós-menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2007; 29:248-52.
- 4 Hachul H, Bittencourt LR, Andersen ML, Haidar MA, Baracat EC, Tufik S. Effects of hormone therapy with estrogen and/or progesterone on sleep pattern in postmenopausal women. *Int J Gynaecol Obstet* 2008; 103:207-12.
- 5 Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev* 1994; 15: 275-300
- 6 Meczekalski B, Czyzyk A. Conventional hormonal replacement therapy in treatment of osteoporosis. *Pol Merkur Lekarski* 2009; 27:72-6.
- 7 Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al., Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288:321-33.
- 8 Canonico M, Scarabin PY. Hormone therapy and risk of venous thromboembolism among postmenopausal women. *Climacteric* 2009; 12:76-80.

- 9 Creasman WT, DiSaia PJ. Hormone replacement and breast cancer risk:reconsidering the data. *Oncology* 2009; 23:1099-100.
- 10 Kresse H, Schönher E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol* 2001; 189:266-74.
- 11 Heinegard D. Proteoglycans and more--from molecules to biology. *Int J Exp Pathol* 2009; 90:575-86.
- 12 Dietrich CP, Nader HB, Straus AH. Structural differences of heparan sulfates according to tissue and species of origin. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 111:865-71.
- 13 Nader HB, Dietrich CP. Natural occurrence and possible biological role of heparin. In: *Heparin: Chemical and biological properties, clinical applications*. Lane DA, Lindahl U. (Eds), London, Edward Arnold Publishers, 1989.
- 14 Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:609-52.
- 15 Dietrich CP. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Braz J Med Biol Res* 1984; 17:5-15.
- 16 Esko JD. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3:805-6.
- 17 Myers K, Socrate S, Tzeranis D, House M. Changes in the biochemical constituents and morphologic appearance of the human cervical stroma during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 144:S82-9.
- 18 Porcionatto MA, Nader HB, Dietrich CP. Heparan sulfate and cell division. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32:539-44.
- 19 Lopes CC, Dietrich CP, Nader HB. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39:157-67.

- 20 Koda JE, Rapraeger A, Bernfield M. Heparan sulfate proteoglycans as receptor for interstitial collagens. *J Biol Chem* 1985; 260:8162-75.
- 21 Kimura T, Yamaoka T, Iwase R, Murakami A. Effect of serine residue on the effectiveness of cationic polypeptide-based gene delivery. *Nucleic Acids Symp Ser* 2000; 44:299-300.
- 22 Gallagher LT. The extent family of the proteoglycans: social residents of the perocellular zone. *Current Opin Cell Biol* 1989; 1:1201-18.
- 23 Cooper GM. *The cell*. 2^a Ed. Brasil, Artmed, 2000.
- 24 Champe PC, Harvey RA. *Bioquímica*. 2^a Ed. Brasil, Artmed, 2002.
- 25 Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 1997; 242:24-33.
26. Prehm P. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem J* 1984; 220:597–600.
- 27 Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, et al. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 1999; 274:25085-92.
- 28 Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. Glycosaminoglycans: molecular propeties, protein interaction and role in physiological processes. *Physiol Rev* 1991; 2:481-538.
- 29 Gibson PR, Fraser JRE, Colman JC, Jones PA, Jennings G, Dudley FJ. Change in serum hyaluronan: a simple index of short-term drug induced changes in hepatic sinusoidal perfusion. *Gastroenterology* 1993; 105:470-4.
- 30 Nogueira MD, Freitas PB, Martins JRM, Sampaio LO, Dietrich CP, Parise ER. Study of hyaluronan contents in peritoneum, ascites and serum from different experimental models. *International Symposium on Extracellular Matrix*, 24-7 September 2000. Angra dos Reis, R.J.
- 31 Friedman SL. Cytocines as fibrogenesis. *Sem Liver Dis* 1999; 19:129-40.

- 32 Nader HB, Martins JR, Santos VN, Leite-Mor MM, Kondo M, Lanzoni VP, et al. Serum laminin, type IV collagen and hyaluronan as fibrosis markers in com-alcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:747-53.
- 33 Martins JR, Passerotti CC, Maciel RM, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem* 2003; 319:65-72.
- 34 Martins JR, Furlanetto RP, Oliveira LM, Mendes A, Passarotti CC, Chiamolera MI, et al. Comparison of practical methods for urinary glycosaminoglicans and serum hyaluronan with clinical activity scores in patients with Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol* 2004; 60:726-33.
- 35 Delpech B, Girard N, Bertrand MN, Courel V, Chauzy A, Delpech J. The origin of hyaluronectin in human tumors. *J Intern Med* 1997; 241:42.
- 36 Marcondes S, Baú EC, Antunes E, Dietrich CP, Nader HB, De Nucci G. Inhibition of heparin synthesis by methotrexate in rats *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:169-75.
- 37 Heldin P. Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:967-73.
- 38 Brimacombe JS, Weber JM. Mucopolysaccharides. Chemical structure, distribution and isolation. London, Elsevier Publising Company, 1964.
- 39 Michelacci YM, Dietrich CP. Structure of chondroitin sulphate from whale cartilage, distribution of 6- and 4-sulphated oligassacarides in the polymer chain. *Int J Biol Macromol* 1986; 8:108-13.
- 40 Sampaio LO, Nader HB. Emergence and structural characteristics of chondroitin sulfates in the animal kingdom. *Adv Pharmacol* 2006; 53:233-51.
- 41 Carney SL, Muir H. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Physiol Reviews* 1988; 68:858-910.

- 42 Michelacci YM, Horton DSPQ. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. *Biochem Physiol* 1989; 92:651-8.
- 43 Wight TN, Ross R. Proteoglycans in primate arteries II. Systems and secretion of glycosaminoglycans by arterial smooth muscle cells in culture. *J Cell Biol* 1975; 67:675-85.
- 44 Wight TN, Heinegard DK, Hascall VC. Proteoglycans: structure and function. In: Hay ED (ed). *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2^a ed. New York, Plenum, 1991.
- 45 Schönherr E, Hausser HJ. Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol* 2000; 7:89-101
46. Bali JP, Cousse H, Neuzil E. Biochemical basis of pharmacologic action chondroitin sulfate on osteoarticular system. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 31:58-68.
- 47 Sampaio LO, Dietrich CP, Giannotti Filho O. Changes in the sulfated mucopolysaccharide composition in mammalian tissue during growth and in cancer tissue. *Biochim Biophys Acta* 1977; 498:123-31.
- 48 Dietrich CP, Armelin HA. Sulfated mucopolysaccharides from normal Swiss 3T3 cells and its tumorigenic variant ST1: Possible role of chondroitin sulfates in neoplastic transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 84:794-801.
- 49 Dietrich CP, Sampaio LO, Montes De Oca H, Nader HB. Role of sulfated mucopolysaccharides in cell recognition and neoplastic transformation. *An Acad Brasil Cienc* 1980; 52:179-86.
- 50 Jerônimo SM, Sales AO, Fernandes MZ, Melo FP, Sampaio LO, Dietrich CP, et al. Glycosaminoglycan structure and content differ according to the origins of human tumors. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27:253-8.
- 51 Tovari J, Paku S, Raso E, Pogany G, Kovalszky I, Ladanyi A, et al. Role of sinusoidal heparan sulfate proteoglycan in liver metastasis formation. *Int J Cancer* 1997; 71:825-31.

- 52 Martins JRM, Gadelha ME, Fonseca SM, Sampaio LO, Pontes PAL, Dietrich CP, et al. Patients with head and neck tumors excrete a chondroitin sulfate with a low degree of sulfation. A new tool for diagnosis and follow-up of cancer therapy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122:115-8.
- 53 Nurcombe V, Smart CE, Chipperfield H, Cool SM, Boill YB, Hondermarck H. The proliferative and migratory activities of breast cancer cells can be differentially regulated by heparan sulfates. *J Biol Chem* 2000; 275:309-18.
- 54 Wielenga VJ, Van der Voort R, Taher TE, Smith L, Beuling EA, Van Krimpen C, et al. Expression of c-Met and heparan-sulfate proteoglycan forms of CD44 in colorectal cancer. *Am J Pathol* 2000; 157:1563-73.
- 55 Berto AGA, Sampaio LO, Franco CR, Cesar RM, Michelacci YM. A comparative analysis of structure and spatial distribution of decorin in human leiomyoma and normal myometrium. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1619:98-112.
- 56 Frasson LA. Heparan sulfate proteoglycans: structure and properties. In: Lane DA, Lindahl U. (Eds) London, Edward Arnold Publishers;1989.
- 57 Frasson LA, Malmström A. Structure of pig skin dermatan sulfate. Distribution of D-glucuronic acid residues. *Eur J Biochem* 1971; 18:422-30.
- 58 Población CA, Michelacci YM. Structural differences of dermatan sulphate from different origins. *Carbohydr Res.* 1986; 147:87-100.
- 59 Scott JE, Oxford CR. Dermatan sulphate- rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the band d in the gap region. *Biochem J* 1981; 197:213-16.
- 60 Scott JE. Dermatan sulfate proteoglycans. In: Hill C (Editor). Chemistry, Biology, Chemical Pathology. London: Portland Press. 1993.
- 61 Merle B, Durussel L, Delmas PD, Clezardin P. Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycans side chain. *J Cell Biochem* 1999; 75:538-46.

- 62 Nakamura T, Nagai Y. Developmental changes in the synthesis of glycosaminoglycans and collagen in embrionic chick skin. *Biochem J* 1980; 87:629-31.
- 63 Trowbridge JM, Rudisill JA, Ron D, Gallo RL. Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7). *Issue* 2002; 42:815-20.
- 64 Dietrich CP, Dietrich SMC. Eletrophoretic behaviour of acid mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem* 1976; 70:645-7.
- 65 Dietrich CP, Tersariol ILS, Toma L, Moraes CT, Porcionatto MA, Oliveira FW, et al. Structure of heparan sulfate: identification of variable and constant oligossaccharide domains in eight heparan sulfate of different origins. *Cell Mol Biol* 1998; 44:417-29.
- 66 Turnbull JE, Gallagher JT. Molecular organization of heparan sulphate from human skin fobroblast. *Biochem J* 1990; 265:715-24.
- 67 Gambarini AG, Miyamoto CA, Lima GA, Nader HB, Dietrich CP. Mitogenic activity of acidic fibroblast growth factor is enhanced by highly sulfated oligosaccharides derived from heparin and heparan sulfate. *Mol Cell Biochem* 1993; 124:121-9.
- 68 Tersariol ILS, Ferreira TMPC, Medeiros MGL, Porcionatto MA, Moraes CT, Abreu LRD, et al. Sequencing of heparan sulphate proteoglycans identification of variable and constant oligossaccharide regions in eigh hepran sulphate proteoglycans of diferent origins. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27:2097-102.
- 69 Franco CR, Rocha HA, Trindade ES, Santos IA, Leite EL, Veiga SS, et al. Heparan sulfate and control of cell division: adhesion and proliferation of mutant CHO-745 cells lacking xylosyl transferase. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34:971-5.
- 70 Moreira CR, Lopes CC, Cuccovia IM, Porcionatto MA, Dietrich CP, Nader HB. Heparan sulfate and control of endothelial cell proliferation: increased synthesis during the S phase of the cell cycle and inhibition of thymidine incorporation

induced by ortho-nitrophenyl-beta-D-xylose. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1673:178-85.

- 71 Kanwar YS, Farquhar MG. Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:1303-7.
- 72 Kanwar YS, Caulingl T, Gallo GR, Lamm ME. Interaction of immune-complexes with glomerular heparan sulfate proteoglycan. *Kidney Int* 1986; 30:842-51.
- 73 Porcionatto MA, Pinto CRM, Nader HB, Dietrich CP. Heparan sulfate proteoglycan and control of cell proliferation: enhanced synthesis induced by phorbol ester (PMA) in early G₁-S cell cycle transition. *Brazilian J Med Biol Res* 1994; 27:2185-90.
- 74 Wolanska M, Sobolewski K, Drozdewicz M, Bankowski E. Extracellular matrix components in uterine leiomyoma and their alteration during the tumour growth. *Mol Cell Biochem* 1998; 189:1452-6.
- 75 Guerrini M, Agulles T, Bisio A, Hriscovini M, Lay L, Naggi A, et al. Minimal heparin/heparan sulfate sequences for binding to fibroblast growth factor-1. *Biochem Bioph Acta* 2002; 292:222-30.
- 76 Myers KM, Paskaleva AP, House M, Socrate S. Mechanical and biochemical properties of human cervical tissue. *Acta Biomater* 2008; 4:104-16.
- 77 Croxatto HB. Mechanisms that explain the contraceptive action of progestin implants for women. *Contraception* 2002; 65:21-7.
- 78 Naim A, Haberman S, Burgess T, Navizedeh N, Minkoff H. Changes in cervical length and the risk of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:887-9.
- 79 Afify AM, Craig S, Paulino AF. Temporal variation in the distribution of hyaluronic acid, CD44s, and CD44v6 in the human endometrium across the menstrual cycle. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14:328-33.
- 80 El Maradny E, Kanayama N, Kobayashi H, Hossain B, Khatun S, Liping S, et al. The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. *Hum Reprod* 1997; 12:1080-8.

- 81 Obara M, Hirano H, Ogawa M, Tsubaki H, Hosoya N, Yoshida Y, et al. Changes in molecular weight of hyaluronan and hyaluronidase activity in uterine cervical mucus in cervical ripening. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80:492-6.
- 82 Ji H, Dailey TL, Long V, Chien EK. Prostaglandin E₂-regulated cervical ripening: analysis of proteoglycan expression in the rat cervix. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198:536-7.
- 83 Lopes VA, Luz MR, Souza GN, Fernandes Júnior JA, Simões Mde J, Camano L, et al. Histochemical changes of the glycosaminoglycans in the uterine cervix of pregnant rats after local injection of hyaluronidase. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008; 30:328-34.
- 84 Ekman-Ordeberg G, Akerud A, Dubicke A, Malmström A, Hellgren M. Does low molecular weight heparin shorten term labor? *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010; 89(1):147-50.
- 85 Wang C, Tammi M, Guo H, Tammi R. Hyaluronan distribution in the normal epithelium esophagus, stomach, and colon and their cancers. *Am J Pathol* 1996; 148:1861-9.
- 86 Cencic A, Guillomot M, Koren S, La Bonnardière C. Trophoblastic interferons: do they modulate uterine cellular markers at the time of conceptus attachment in the pig? *Placenta* 2003; 24:862-9.
- 87 Yabushita H, Kishida T, Fusano K, Kanyama K, Zhuo L, Itano N, et al. Role of hyaluronan and hyaluronan synthase in endometrial cancer. *Oncol Rep.* 2005; 13:1101-5.
- 88 Yasuo T, Kitaya K, Yamaguchi T, Fushiki S, Honjo H. Possible role of hematopoietic CD44/chondroitin sulfate interaction in extravasation of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium. *J Reprod Immunol* 2008; 78:1-10.
- 89 Ekman G, Malmstrom A, Uldbjerg N, Ulmsten U. Cervical collagen: an important regulator of cervical function in term labor. *Obstet Gynecol* 1986; 67:633-6.

- 90 Belayet M, Kanayama N, Khatun S, Sumimoto K, Kobayashi T, Terao T. Binding of interleukin-8 to heparan sulphate enhances cervical maturation in rabbits. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:261-9.
- 91 Shi L, Shi SQ, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. Studies of cervical ripening in pregnant rats: effects of various treatments. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:382-9.
- 92 Leppert PC, Kokenyesi R, Klemenich CA, Fisher J. Further evidence of a decorin-collagen interaction in the disruption of cervical collagen fibers during rat gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:805-11.
- 93 Flaumenhaft R, Rifkin DB. The extracellular regulation of growth factor action. *Mol Biol Cell* 1992; 3:1057-65.
- 94 Loewi G, Consden R. Acid mucopolysaccharides of the human uterus. *Nature* 1962; 195:148-50.
- 95 Kofoed JA, Houssay AB, Tocci AA, Curbelo HM. Effects of oestrogens upon glycosaminoglycans in the uterus of rats. *Acta Endocrinol* 1972; 69:87-94.
- 96 Takata K, Terayama H. Hormonal effect on glycosaminoglycans and glycoproteins in uteri of ovariectomized rats. *Biochim Biophys Acta* 1977; 500:333-43.
- 97 Golichowski AM, King SR, Mascaro K. Pregnancy-related changes in rat cervical glycosaminoglycans. *Biochem J* 1980; 192:1-8.
- 98 Cidadão AJ, Thorsteinsdóttir S, David-Ferreira JF. Immunocytochemical study of tissue distribution and hormonal control of chondroitin, dermatan and keratin sulfates from rodent uterus. *Eur J Cell Biol* 1990; 52:105-16.
- 99 Gomes RCT, Simões RS, Soares Jr JM, Nader HB, Simões MJ, Baracat EC. Profile of sulphated glycosaminoglycans content in the murine uterus during the different phases of the estrous cycle. *Rev Assoc Med Bras* 2007; 53:261-6.

- 100 Gomes RCT, Verna C, Nader HB, Simões RS, Dreyfuss JL, Maciel Jr M, et al. Concentration and distribution of hyaluronic acid in mouse uterus throughout the estrous cycle. *Fertil Steril* 2008; 76:12-5.
- 101 Cubas JJM, Simões RS, Nader HB, Oliveira-Filho RM, Simões MJ, Baracat EC, et al. Glycosaminoglycan distribution in the rat uterine cervix during the estrus cycle. *Clinics* 2009; (trabalho enviado para publicação).
- 102 Tellbach M, Salamonsen LA, Van Damme MP. The influence of ovarian steroids on ovine endometrial glycosaminoglycans. *Glycoconj J* 2002; 19:385-94.
- 103 San Martin S, Soto-Suazo M, Zorn TM. Perlecan and syndecan-4 in uterine tissues during the early pregnancy in mice. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52:53-9.
- 104 D'Souza SS, Daikoku T, Farach-Carson MC, Carson DD. Heparanase expression and function during early pregnancy in mice. *Biol Reprod* 2007; 77:433-41.
- 105 Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA (Editors). Canadian council on animal care's/ guide to the care and use of experimental animals/, 2nd ed, Canada, Bradda Printing Services, 1993.
- 106 Shorr E. A new technique for staining vaginal smears. A single differential stain. *Science* 1941; 94:948.
- 107 Montes GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears on the rat. *Acta Anat* 1988; 133:192-99.
- 108 Baracat EC, Simões MJ, Soares Jr JM, Dardes RC, Silva I, Ohashi EI. Standardization of the dose-effect of oral estrogens and progestogens in adult rats. *Menopause* 1998; 5:263.
- 109 Baracat EC, Simões MJ, Soares Jr JM, Silva EI, Ohashi EI, Simões RS, et al. Determination of physiological doses of oral conjugated equine estrogens and

- medroxyprogesterone acetate in adult oophorectomized rats. *Climateric* 1999; 2:198.
- 110 Calió PL, Santos JM, Simões R, Oliveira-Filho RM, Rosa Maciel GA, de Jesus Simões M, et al. Ultrastructural evaluation of gingival glycosaminoglycans in ovariectomized rats: effects of steroid hormone therapy. *Gynecol Obstet Invest* 2008; 65:12-7.
- 111 Endo RM, Girão MJBC, Sartori MGF, Simões MJ, Baracat EC, Rodrigues de Lima G. Effect of estrogen-progesteron hormonal replacement therapy on periurethral and bladder vessels. *Int Urogynecol J* 2000; 11:120-3.
- 112 Suguita M, Girão MJBC, Simões MJ, Sartori MGF, Baracat EC, Rodrigues de Lima G. A morphological and morphometric study of the vesical mucosa and urethra of castrated female rats following estrogen and/or progestogen replacement. *Clin Exp Obst Gyn* 2000; 27:176-8.
- 113 Jaques LB, Ballieux RE, Dietrich CP, Kavanagh LW. A microelectrophoresis method for heparin. *Can J Physiol Pharmacol* 1968; 46:351-60.
- 114 Weyne GRS. Determinação do tamanho da amostra em pesquisas experimentais na área da saúde. *Arq Med ABC* 2004; 29:87-90.
- 115 Cássaro CM, Dietrich CP. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. *J Biol Chem* 1977; 252(7):2254-61.
- 116 Weinstein M, Liao YH, Slomiany A, Slomiany BL. Glycosaminoglycan patterns in gingival proteoglycans of rat with age. *Arch Oral Biol* 1992; 37(5):323-30.
- 117 Kofoed JA, Houssay AB, Tocci AA, Curbelo HM, Barcelo C. Effects of acetoxypregesterone upon glycosaminoglycans in the uterus and salivary glands of rats. *Horm Metab Res* 1977; 9(1):58-9.
- 118 Paderi JE, Panitch A. Design of a synthetic collagen-binding peptidoglycan that modulates collagen fibrillogenesis. *Biomacromolecules* 2008; 9(9):2562-6.
- 119 Lewis PN, Pinali C, Young RD, Meek KM, Quantock AJ, Knupp C. Structural interactions between collagen and proteoglycans are elucidated by three-

- dimensional electron tomography of bovine cornea. *Structure* 2010; 18(2):239-45.
- 120 Leppert PC. Anatomy and physiology of cervical ripening. *Clin Obstet Gynecol* 1995; 38(2):267-79.
- 121 Sciscione AC, Hayes EJ; Society for Maternal-Fetal Medicine. Uterine artery Doppler flow studies in obstetric practice. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201(2):121-6.
- 122 Feng J, El-Assal ON, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor reduces intestinal apoptosis in neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2006; 41(4):742-7.
- 123 Djunić I, Tomin D, Antonijević N, Gradinac S, Kovac M, Vidović A, et al. Heparin-induced thrombocytopenia occurring after surgical treatment of atrial myxoma-a case report. *Srp Arh Celok Lek* 2009; 137(9-10):540-4.
- 124 Kunze R, Rösler M, Möller S, Schnabelrauch M, Riemer T, Hempel U, et al. Sulfated hyaluronan derivatives reduce the proliferation rate of primary rat calvarial osteoblasts. *Glycoconj J* 2010; 27(1):151-8.
- 125 Daidouji K, Takagaki K, Yoshihara S, Matsuya H, Sasaki M, Endo M. Neoplastic changes in saccharide sequence of dermatan sulfate chains derived from human colon cancer. *Dig Dis Sci* 2002; 47(2):331-7.
- 126 Montz FJ, Bristow RE, Bovicelli A, Tomacruz R, Kurman RJ. Intrauterine progesterone treatment of early endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186(4):651-7.
- 127 Southcott BM. Carcinoma of the endometrium. *Drugs* 2001; 61(10):1395-405.
- 128 Spicer AP, McDonald JA. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem* 1998; 273:1923-32.
- 129 Heldin P. Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36(8):967-73.

- 130 Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, et al. Regulation of lung injury and repair by toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med* 2005; 11:1173-9.
- 131 Haslinger B, Mandl-Weber S, Sellmayer A, Sitter T. Hyaluronan fragments induce the synthesis of MCP-1 and IL-8 in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Cell Tissue Res* 2001; 305(1):79-86.
- 132 Day AJ, de la Motte CA. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol* 2005; 26:637-43.
- 133 Forrester JV, Balazs EA. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology* 1980; 40:435-46.
- 134 McDonald JA, Camenisch TD. Hyaluronan: genetic insights into the complex biology of a simple polysaccharide. *Glycoconj J* 2002; 19(4-5):331-9.
- 135 Hascall VC, Majors AK, De La Motte CA, Evanko SP, Wang A, Drazba JA, et al. Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochim Biophys Acta* 2004; 1673:3-12.
- 136 Spicer AP, Tien JY. Hyaluronan and morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004; 72(1):89-108.
- 137 Zorn TMT, Pinhal MAS, Nader HB, Carvalho JJ, Abrahamsohn PA, Dietrich CP. Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. *Cell Mol Biol* 1995; 41:97-106.
- 138 Stern R, Asari AA, Kazuki N, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *Eur J Cell Biol* 2006; 85:699-715.
- 139 Uchiyama T, Sakuta T, Kanayama T. Regulation of hyaluronan synthases in mouse uterine cervix. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327(3):927-32.
- 140 Toole BP. Hyaluronate turnover during chondrogenesis in the developing chick limb and axial skeleton. *Develop Biol* 1972; 29:321-9.
- 141 Ludmir J, Sehdev HM. Anatomy and physiology of the uterine cervix. *Clin Obstet Gynecol* 2000; 43(3):433-9.

- 142 Kavanagh J, Kelly AJ, Thomas J. Hyaluronidase for cervical priming and induction of labour. *Cochrane Database Syst Rev* 2001; (2):CD003097.
- 143 Rajabi MR, Quillen Jr EW, Nuwayhid BS, Brandt R, Poole AR. Circulating hyaluronic acid in nonpregnant, pregnant, and postpartum guinea pigs: elevated levels observed at parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166(1 Pt 1):242-6.
- 144 Takemura M, Itoh H, Sagawa N, Yura S, Korita D, Kakui K, et al. Cyclic mechanical stretch augments hyaluronan production in cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(9):659-65.