



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

LIZANDRA MAIA DE SOUSA

**EFEITOS DA PARIDADE E IDADE NA CONDRÓGENESE E OSTEOGÊNESE NA
ÊNTESE DA SÍNFISE PÚBLICA EM CAMUNDONGOS DURANTE O FIM DA PRENHEZ E
NO PÓS-PARTO**

Campinas

2022

LIZANDRA MAIA DE SOUSA

**EFEITOS DA PARIDADE E IDADE NA CONDRÓGENESE E OSTEOGÊNESE NA
ÊNTESE DA SÍNFISE PÚBLICA EM CAMUNDONGOS DURANTE O FIM DA PREENHIZ E
NO PÓS-PARTO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na área de
Biologia Tecidual.

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Roberto Consonni

Coorientadora: Dr^a. Bianca Gazieri Castelucci Bataglioli

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA LIZANDRA MAIA DE SOUSA E
ORIENTADA PELO PROF. DR. SÍLVIO ROBERTO
CONSONNI.

Campinas

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

So85e Sousa, Lizandra Maia, 1995-
Efeitos da paridade e idade na condrogênese e osteogênese na êntese da sínfise púbica em camundongos durante o fim da prenhez e no pós-parto / Lizandra Maia de Sousa. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Sílvio Roberto Consonni.
Coorientador: Bianca Gazieri Castelucci Bataglioli.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Paridade. 2. Cartilagem. 3. Sínfise púbica. 4. Prenhez. 5. Condrogênese. I. Consonni, Sílvio Roberto, 1986-. II. Castelucci, Bianca Gazieri, 1989-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of parity and age on chondrogenesis and osteogenesis in pubic symphysis entheses in mice during late pregnancy and postpartum

Palavras-chave em inglês:

Parity
Cartilage
Pubic symphysis
Pregnancy, Animal
Chondrogenesis

Área de concentração: Biologia Tecidual

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Sílvio Roberto Consonni [Orientador]
Talita Miguel Marin
Viviane de Souza Rosa

Data de defesa: 29-04-2022

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4843-402X>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1274985693010560>

Campinas, 29 de abril de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Sílvio Roberto Consonni (Orientador)

Dra. Talita Miguel Marin

Dra. Viviane de Souza Rosa

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxos de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

“Working hard is important.

But there is something that matters even more:

Believing in yourself.”

J.K Rowling (Harry Potter and the Order of the Phoenix)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Oscar e Sônia por todo apoio e amor incondicional. Ao meu irmão, Leandro, por alimentar em mim o amor pela ciência desde a infância.

AGRADECIMENTOS

“A medida do amor é amar sem medida”

(Santo Agostinho)

Agradeço primeiramente à Deus, pois sem Ele eu não sou absolutamente nada. Ele é a minha fortaleza. Obrigada Senhor, por me permitir realizar meus planos e sonhos que também são os Teus!

Ao meu Pai, Oscar, minha mãe, Sônia, e meu irmão, Leandro obrigada por todo exemplo, dedicação, amor incondicional e por sempre me proporcionar todo amparo que preciso. Vocês são luz em minha vida, e tudo teria sido bem mais difícil sem o apoio e paciência de vocês comigo. Obrigada por tudo e por tanto!

À toda minha família, meus tios, tias, primos e primas, obrigada por mesmo apesar da distância física, sempre estarem comigo. Por todas as risadas, conversas gostosas e conselhos.

Ao meu querido orientador e amigo, Sílvio. Obrigada por ter me acolhido no laboratório desde a IC e ter me dado tantas oportunidades as quais colaboraram não só para meu crescimento profissional, mas também pessoal. Obrigada por todo apoio, confiança, paciência, dedicação, companheirismo, por sempre ouvir minhas ideias loucas e tentar responder as perguntas mais loucas ainda. Obrigada também pelo grande e excelente exemplo como professor e por sempre me mostrar como a biologia tecidual sempre pode ser cada vez mais fascinante!

À Bianca, minha querida co-orientadora! Por me acolher com tanto carinho quando entrei no lab, por sempre ter tido paciência comigo e ter escutado todos os meus medos. Obrigada por compartilhar comigo seu conhecimento, por toda a dedicação e sempre estar disposta a me ajudar. E é claro, sou grata também as boas conversas e risadas que tivemos.

À minha querida amiga gêmea, Mel, por sempre estar comigo em todos os momentos. Ser minha confidente e sempre torcer por mim. Obrigada por fazer meus dias mais leves com conversas aleatórias e por compartilhar memes comigo. Você certamente é a irmã que o IB me deu!

Aos meus queridos amigos Dio e João, por compartilharem comigo suas experiências com a pós-graduação, pelas vídeo chamadas, por todas as conversas e risadas gostosas. Obrigada por desde a graduação tornarem tudo mais agradável.

À minha amiga de infância, Vanessa, a quem eu agradeço de todo coração por estar presente em minha vida em cada momento especial. Obrigada por de fato ser para mim como irmã e por todos os bons momentos que vivemos juntas.

À minha querida amiga Maria do Carmo, por sempre ouvir meus desabafos com tanto carinho, e sempre me dar os melhores conselhos. Obrigada por sempre rezar por mim. Você é um anjo em forma de amiga que Deus me deu.

À Bere, minha grande amiga de tantos anos. Obrigada por mesmo apesar da distância ser tão presente em minha vida e acreditar em mim. Obrigada por ser luz e por sempre ter tempo para jogar conversa fora!

Ao meu eterno e grande amigo Pexeira (*in memoriam*), eu não poderia fazer uma dissertação e não agradecer a você, meu eterno pai da Bio. Lembro como se fosse ontem como você ficou feliz por mim, na graduação, quando eu havia dito que eu tinha me encontrado na histologia e de como você sempre se alegrava a cada conquista minha, seja pequena ou grande. Você sempre esteve comigo, para tudo o que eu precisasse. Eu sempre serei grata por cada sorriso, por sempre ter me dado o ombro para chorar, por todos os conselhos, por todas as conversas filosóficas sobre a vida, além de cada abraço apertado e gostoso.

Às minhas colegas de lab, Cíntia, Paula, Gabriela e Giovana. Obrigada por todo companheirismo, ajuda e conversas e risadas durante as pausas dos experimentos.

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

Ao meu querido Instituto de Biologia por ter sido minha segunda casa desde a graduação.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo: 131032/2020-8.

RESUMO

Os processos fisiológicos da gravidez e do parto impactam adaptações drásticas do canal do parto e do assoalho pélvico para permitir distensão acentuada seguida de retorno ao estado pré-gestacional. No entanto, numerosos estudos epidemiológicos sugerem que muitas mulheres não conseguem se recuperar completamente desse evento; de fato, o trauma da distensão dos órgãos do canal de parto parece desempenhar um papel importante na causa do prolapso de órgãos pélvicos (POP), caracterizado pelo descenso de um ou mais órgãos pélvicos, como a bexiga, o útero, o reto e o intestino delgado pelo canal vaginal. Durante a prenhez, o canal de parto se remodela para permitir um parto seguro. Nessa remodelação hormonalmente regulada, a sínfise púbica, uma junção fibrocartilaginosa, é uma das estruturas que passa por modificações, as quais resultam no afastamento dos ossos púbicos com a formação do ligamento interpúbico, o qual se conecta ao osso pela êntese, uma estrutura de transição com gradações e organização diferencial celular e dos componentes de MEC. Após o primeiro parto, o processo de retorno assegura a homeostase e a estabilidade mecânica dos tecidos pélvicos. Sucessivos partos impactam a recuperação da histoarquitetura articular. Contudo, são pouco conhecidos os efeitos da multiparidade e da idade nas células e na MEC da entese da sínfise púbica durante a prenhez e o retorno pós-parto, o que pode auxiliar na compreensão da fisiopatologia do prolapso de órgãos pélvicos. Deste modo, o presente estudo buscou compreender e comparar as alterações da entese entre camundongos fêmeas primíparas e múltiparas senescentes durante a prenhez e o pós-parto. Durante a prenhez e o pós-parto, camundongos C57BL6/6J primíparos e múltiparas senescentes foram estudados a microscopia de luz convencional e polarizada, microscopia eletrônica de transmissão, imuno-histoquímica e PCR em tempo real. Foram caracterizadas alterações morfológicas e moleculares no que diz respeito à população celular, aos componentes da MEC, à imunolocalização e à expressão gênica de marcadores condrogênicos e osteogênicos na êntese de animais múltiparos quando comparadas às enteses de animais primíparos. Apesar de não ocorrer a recuperação da cartilagem na articulação interpúbica nos animais múltiparas senescentes, nossos resultados sugerem que a êntese contém células metabolicamente ativas durante a prenhez e o pós-parto, mas com perfil de expressão de marcadores condrogênicos e osteogênicos reduzidos em função da paridade e da idade. Assim, nosso estudo evidencia alterações na sínfise púbica de camundongos múltiparas senescentes e tais alterações podem fornecer bases para compreender disfunções nos mecanismos biológicos capazes de remodelar o canal do parto, alterando conseqüentemente a estabilidade pélvica, um fator crítico para a compreensão da fisiopatologia do POP.

Palavras-chave: Paridade, cartilagem, sínfise púbica, prenhez, condrogênese.

ABSTRACT

The physiological processes of pregnancy and childbirth impact drastic adaptations of the birth canal and pelvic floor to allow for marked distention followed by return to a pre-gestational state. However, numerous epidemiological studies suggest that many women fail to fully recover from this event. In fact, trauma from distention of the organs of the birth canal appears to play an important role in pelvic organ prolapse (POP), characterized by the descent of one or more pelvic organs, such as the bladder, uterus, rectum, and small intestine, through the vaginal canal. During of pregnancy, the birth canal remodeling for safe delivery. In this remodeling hormonally regulated, the pubic symphysis, a fibrocartilaginous junction, is the one of the structures that changes and results in the separation of pubic bones by the formation of an interpubic ligament whose connection to the bone in through the presence of the enthesis, a structure of transition formed with gradations and differential organization of cells and ECM components. After the first delivery, the recovery process ensures homeostasis and mechanical stability of the pelvic tissues. Successive deliveries impact the recovery of joint histoarchitecture. Nevertheless, are not well understood the effects of multiparity and age in the cells and extracellular matrix in enthesis of pubic symphysis during recovery postpartum and should be considered to better understand the factors thar lead to organ prolapse. Thus, this study sought understand and comparing enthesis changes between female mice multiparous senescent during pregnancy and postpartum. During pregnancy and postpartum, mice C57BL6/6J primiparous and multiparous senescent was examined by conventional and polarized light microscopy, transmission electron microscopy, immunohistochemistry, and PCR real time. Were characterized morphological and molecular changes in cell population, ECM components, as well as immunolocalization and gene expression of chondrogenic and osteogenic markers we in the enthesis of multiparous animals when compared to the entheses of primiparous animals. However, although there are changes and there is no return of cartilage in the interpubic joint in multiparous senescent animals, our results suggest that the enthesis is metabolically active during pregnancy and postpartum, but with but with a reduced expression profile of chondrogenic and osteogenic due to parity and age. Thus, our study evidence alterations in the pubic symphysis of senescent multiparous mice and such alterations may provide a basis for understanding dysfunctions in the biological mechanisms capable of remodeling the birth canal, consequently altering pelvic stability, a critical factor for understanding the pathophysiology of POP.

Key words: Parity, cartilage, pubic symphysis, pregnancy, chondrogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da localização anatômica da sínfise púbica e da composição dos seus tecidos em camundongos.23
- Figura 2.** Representação esquemática dos processos fisiológicos graduais das fases de remodelação da sínfise púbica durante a prenhez e o pós-parto de camundongos.24
- Figura 3.** Representação esquemática das quatro zonas que compõe a êntese fibrocartilaginosa.....27
- Figura 4.** Fatores de transcrição expressos na via de sinalização durante a diferenciação de condrócitos e condrócitos hipertróficos no processo de condrogênese de tecidos cartilagosos.29
- Figura 5.** Representação esquemática do desenho experimental para o acasalamento e determinação dos dias para análises de estudo em camundongos fêmeas C57BL6/6J, nulíparas e múltiparas senescentes.35
- Figura 6.** Representação esquemática das metodologias realizadas nos dias analisados para estudo em camundongos fêmeas C57BL6/6J, primíparas e múltiparas senescentes.36
- Figura 7.** Fotomicrografias representativas das modificações teciduais da êntese na sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas e em múltiparas senescentes durante a prenhez.45
- Figura 8.** Elétron-micrografias representativas da população celular da êntese da articulação interpúbica em camundongos fêmeas primíparas e múltiparas senescentes durante a prenhez.....47
- Figura 9.** Fotomicrografias representativas da êntese na articulação interpúbica e da birrefringência das fibras colágenas, sob luz convencional e polarizada, durante o remodelamento tecidual da êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas e múltiparas senescentes na prenhez.....49
- Figura 10.** Fotomicrografias representativas do remodelamento tecidual da êntese na articulação interpúbica em camundongos fêmeas primíparas e múltiparas senescentes durante o pós-parto.....51
- Figura 11.** Elétron-micrografias representativas da população celular da êntese na articulação interpúbica em camundongos fêmeas primíparas e múltiparas senescentes no pós-parto. .53
- Figura 12.** Fotomicrografias representativas da articulação interpúbica e da birrefringência das fibras colágenas, sob microscopia de luz polarizada, durante o remodelamento tecidual

da êntese na sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante o pós-parto.....54

Figura 13. Eletron-micrografias representativas da secção transversal das fibrilas colágenas e histogramas dos intervalos da distribuição das frequências do diâmetro das fibrilas da êntese na sínfise púbica de fêmeas primíparas e múltíparas senescentes, durante a prenhez e o pós-parto. Tabela com a média e o erro-padrão dos diâmetros das fibrilas por grupo e box-plot dos diâmetros das fibrilas de colágeno.56

Figura 14. Representação gráfica da expressão gênica de colágeno do tipo II (*Col2a1*) na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante a prenhez e pós-parto.58

Figura 15. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço-temporal de colágeno do tipo II na articulação interpúbica em camundongos fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante a prenhez.....59

Figura 16. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de colágeno do tipo II na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante o pós-parto.60

Figura 17. Representação gráfica da expressão gênica de *Doublecortin* na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante a prenhez e o pós-parto.61

Figura 18. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de *Doublecortin* na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante a prenhez.63

Figura 19. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de *Doublecortin* na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante o pós-parto.....64

Figura 20. Representação gráfica da expressão gênica de Sox-9 na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante a prenhez e o pós-parto.....65

Figura 21. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de SOX-9 na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante a prenhez.....67

Figura 22. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de SOX-9 na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante o pós-parto.....68

Figura 23. Representação gráfica da expressão gênica de Runx-2 na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante a prenhez e o pós-parto.....	69
Figura 24. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de Runx-2 na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante a prenhez.....	71
Figura 25. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de Runx-2 na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante o pós-parto.....	72
Figura 26. Representação gráfica da expressão gênica de Colágeno 10 (<i>Col10a1</i>) na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante a prenhez e pós-parto.	73
Figura 27. Representação gráfica da expressão gênica de <i>sonic hedgehog</i> na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante a prenhez e o pós-parto	74
Figura 28. Diagramas da distribuição temporal da expressão gênica relativa de <i>Col2a1</i> , <i>DCX</i> , <i>Sox-9</i> , <i>Runx-2</i> , <i>Col10a1</i> e <i>Shh</i> , e suas sobreposições obtidos por PCR em tempo real e normalizados em função dos valores máximos de expressão gênica na articulação interpúbica de camundongos primíparas e múltíparas senescentes.	76
Figura 29. Fotomicrografias representativas dos controles negativos da reação imunohistoquímica na articulação interpúbica em camundongos durante a prenhez e pós-parto de animais primíparas e múltíparas senescentes.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de animais utilizados em cada dia de estudo para realização das diferentes técnicas.....	36
Tabela 2. Anticorpos primários, com seus respectivos códigos e diluições utilizadas para o desenvolvimento da técnica de imuno-histoquímica.	39
Tabela 3. Anticorpo secundário, com seu respectivo código e diluição utilizada para o desenvolvimento da técnica de imuno-histoquímica.	39
Tabela 4. Sequencias dos oligonucleotídeos <i>Forward</i> (F) e <i>Reverse</i> (R) obtidos no NCBI e utilizados na quantificação da expressão gênica de <i>Mus musculus</i> por meio da técnica PCR em tempo real.....	40
Tabela 5. Programa de ciclagem de temperatura para PCR.....	42
Tabela 6. Nomenclatura dos genes e proteínas utilizadas para a técnica de PCR em tempo real e imuno-histoquímica.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

21dpp	21 dias pós-parto
3dpp	3 dias pós-parto
ADAMTS1	<i>ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif 1</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CH	Cartilagem hialina
Col	Fibrilas de colágeno
Col10a1	Colágeno do tipo X
Col2a1	Colágeno do tipo II
D12	12º dia de prenhez
D15	15º dia de prenhez
D18	18º dia de prenhez
Dcx	Doublecortin
FC	Fibrocartilagem
FE	Fibras elásticas
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
iNOS	Óxido nítrico sintetase
Lip	Ligamento interpúbico
MEC	Matriz extracelular
MMP-2	Metaloprotease-2
MMP-8	Metaloprotease-8
MMP-9	Metaloprotease-9
N	Núcleo
Nu	Nucléolo
OP	Oso púbico

PBS	Tampão de fosfato salino
PD	Porção distal
POP	Prolapso de órgãos pélvicos
PR	Porção proximal
REG	Retículo endoplasmático granular
Runx-2	<i>Runt - related transcription factor 2</i>
Shh	Sonic Hedgehog
Sox-9	<i>SRY-Related High-Mobility Group Box 9</i>
SP	Símfise púbica
TBS	Tris-HCl Salino
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TIMP-1	Inibidor tecidual de metaloprotease-1
TIMP-2	Inibidor tecidual de metaloprotease-2
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
α-SMA	alfa-actina de músculo liso

LISTA DE SÍMBOLOS

°C Graus Célsius

μ Micro

α Alfa

β Beta

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
LISTA DE SÍMBOLOS	17
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Prolapso de órgãos pélvicos.....	21
1.2 O canal de parto e a sínfise púbica.....	22
1.3 Canal de parto: da sínfise púbica ao ligamento interpúbico	24
1.4 A êntese	26
1.5 A Remodelação tecidual e a Multiparidade.....	29
1.6 Modelo de estudo	30
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 ANIMAIS E PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	35
3.1.1 Animais	35
3.1.2 Coleta de amostras teciduais	37
3.2 MICROSCOPIA DE LUZ CONVENCIONAL E POLARIZADA.....	37
3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	37
3.3.1 Processamento das amostras	37
3.3.2 Análises de morfometria.....	38
3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA	38
3.5 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA: PCR EM TEMPO REAL.....	40
3.5.1 Desenho de <i>Primers</i>	40
3.5.2 Extração de RNA.....	40
3.5.3 Síntese de cDNA.....	42
3.5.4 PCR em tempo real.....	42
3.5.5 Análise estatística	42
4. RESULTADOS	43
4.1 Análise morfológica e ultraestrutural na êntese da articulação interpúbica durante a prenhez	44

4.2	Análise morfológica e ultraestrutural na êntese da articulação interpúbica durante o pós-parto	50
4.3	Análise do diâmetro das fibrilas colágenas na êntese da articulação interpúbica de animais primíparos e múltíparos senescentes durante a prenhez e pós-parto....	55
4.4	Análise molecular e da imunolocalização de marcadores condrogênicos e osteogênicos na articulação interpúbica e na êntese de animais primíparos e múltíparos senescentes durante a prenhez e o pós-parto	57
5.	DISCUSSÃO	77
6.	CONCLUSÕES	88
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
8.	ANEXOS	100
8.1	Anexo 1: Nomenclatura dos genes e proteínas	101
8.2	Anexo 2: Controle negativo da reação de imuno-histoquímica	102
8.3	Anexo 3: Certificado de legislação e procedimentos para utilização de animais em laboratório	103
8.4	Anexo 4: Certificado e declaração de Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA)	104

1. INTRODUÇÃO

1.1 Prolapso de órgãos pélvicos

Os processos fisiológicos da gravidez e do parto impactam adaptações drásticas do canal do parto e do assoalho pélvico para permitir distensão acentuada seguida de retorno ao estado pré-gestacional. No entanto, numerosos estudos epidemiológicos sugerem que muitas mulheres não conseguem se recuperar completamente desse evento; de fato, o trauma da distensão dos órgãos do canal de parto parece desempenhar um papel importante na causa do prolapso de órgãos pélvicos (POP) (Mant *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 2006).

O POP é uma patologia caracterizada pelo descenso de um ou mais compartimentos vaginais (parede anterior, parede posterior e parede apical) (Hendriz *et al.*, 2002; Summers *et al.*, 2006). Esse descenso é geralmente acompanhado pela fraqueza da fáschia endopélvica, o que pode resultar no prolapso de um ou mais órgãos pélvicos, como a bexiga, o útero, o reto e o intestino delgado pelo canal vaginal (Choi e Hong, 2014). Na população brasileira, um estudo com 377 mulheres com mais de 29 anos, mostrou a prevalência do POP em 67% delas (Araújo *et al.*, 2009). Enquanto nos Estados Unidos, as mulheres apresentam aproximadamente 11,1% de risco ao longo da vida para submissão à cirurgia de correção de prolapso genital, sendo que até um terço das mesmas necessitarão de reintervenção cirúrgica (Tinelli *et al.*, 2010). O POP pode ocorrer em qualquer idade, no entanto, entre as mulheres diagnosticadas, existe uma prevalência significativamente maior em mulheres com idade avançada (Frantz *et al.*, 2010).

Uma vez que o canal do parto está diretamente relacionado ao suporte aos órgãos pélvicos (DeLancey, 1994; Norton, 1993), propôs-se que danos a qualquer componente desse complexo mecanismo de suporte pode resultar em perda do suporte vaginal e conseqüentemente em POP. Esta proposição é largamente baseada em dados que sugerem que o parto é o maior fator de risco independente para o desenvolvimento de disfunções do assoalho pélvico (Carley *et al.*, 1999; Jones, 2010). Lesões transitórias e de longa duração na vagina e seus tecidos de suporte foram documentadas após o parto, e a maioria das mulheres múltiparas tem alguma evidência anatômica de disfunção no suporte pélvico (O'Boyle *et al.*, 2005; De Lancey *et al.*, 2003; De Lancey *et al.*, 2007). Outros fatores de risco sugeridos incluem menopausa, obesidade, idade, cirurgia prévia e predisposição genética (Gurel *et al.*, 1999; Lukacz *et al.*, 2006, Jones *et al.*, 2010; Stoffel *et al.*, 2009).

No que diz respeito à dilatação e ao relaxamento crônicos do canal de parto e dos ligamentos pélvicos, frequentemente associados ao número de partos (Thomas, 1980), não se conhecem, até o presente momento, os mecanismos pelos quais a prenhez, o parto e o envelhecimento levam ao enfraquecimento de órgãos pélvicos e estruturas suportes destes órgãos (Liu *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2004; Timmons *et al.*, 2006). O suporte fisiológico da pelve é mantido pela integridade dos ligamentos. No entanto, ficou evidente que as deleções

experimentais de moléculas-chaves na fibrillogênese da elastina são capazes de induzir o POP em camundongos, de modo similar àquele observado em primatas (Drewes *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2004).

Os camundongos com mutações no gene que codifica a Fibulina-5 (Fbln5^{-/-}) apresentam numerosos sinais de elastinopatias, as quais incluem pele frouxa, pulmões enfisematosos e grandes vasos dilatados e tortuosos. É importante ressaltar que esses camundongos também demonstraram POP notavelmente semelhante àquele em primatas (isto é, a vagina e o colo do útero são descendentes e herniados através da musculatura do assoalho pélvico) (Drewes *et al.*, 2007). A observação de POP em série na matriz reprodutiva de camundongos Fbln5^{-/-} mostrou que esses animais progrediram ao POP grave em função da idade e paridade (Wieslander *et al.*, 2009). Como em humanos, o aumento da paridade e da idade parece acelerar o processo da doença em modelos murinos. Portanto, as matrizes reprodutivas de camundongos parecem ser modelos para avaliar os efeitos do POP nas propriedades biomecânicas do canal do parto.

1.2 O canal de parto e a sínfise púbica

Em mulheres, as modificações morfológicas do canal de parto e, particularmente na sínfise púbica, mostram-se discretas durante a gestação quando comparadas às encontradas em modelos animais. Entretanto, relatos de dores púbicas são frequentemente negligenciados durante o pós-parto (Becker *et al.*, 2010). Estudos com emprego de técnicas de alta precisão, como a ressonância magnética, em mulheres primíparas, demonstram que, além das conhecidas lesões nos componentes do assoalho pélvico em indivíduos de grupos de risco, são observados fraturas e edemas de medula dos ossos púbicos, assim como rupturas capsulares ao longo de regiões posteriores e inferiores da sínfise, locais de intensa atuação das forças de tração (Brandon *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2011).

O conjunto de mecanismos para que haja expulsão do feto é complexo e envolve intensa remodelação tecidual das estruturas no canal de parto (Fischer *et al.*, 2015). Esse remodelamento inclui longa fase preparatória de condicionamento que, posteriormente, é seguida por trabalho ativo (Buhimschi *et al.*, 2009). A remodelação do tecido conjuntivo é necessária para a ocorrência facilitada do trabalho de parto e seu sucesso (Moro *et al.*, 2012; Consonni *et al.*, 2012). O canal de parto é composto por partes moles – segmento inferior do útero, cérvix, vagina e a região vulvo perineal – e duras – bacia óssea, na qual está localizada a sínfise púbica. Essas partes são conhecidas como trajeto mole e trajeto duro, respectivamente (Becker *et al.*, 2010 e Abramowitch *et al.*, 2009).

A sínfise púbica (SP) é a articulação entre os ossos púbicos e consiste em um disco fibrocartilaginoso localizado entre os coxins de cartilagem hialina que cobrem esses ossos nas suas extremidades mediais (Figura 1). Essa articulação possui, ao seu redor, tecido

conjuntivo denso correspondendo a uma camada superficial contínua ao periósteo (Joazeiro *et al.*, 2014). Essa junção fibrocartilaginosa, além de fazer parte do conjunto de elementos do sistema musculoesquelético, oferece suporte aos órgãos pélvicos no papel de prover estabilidade e de auxiliar na neutralização das forças de compressão atuantes sobre a pelve durante a movimentação (Cunningham *et al.*, 2007). A articulação destaca-se no seu papel ativo durante a prenhez de modelos animais – como camundongos e cobaias –, pois passa por drásticas modificações para a acomodação do canal do parto (Sherwood 1994; Becker *et al.*, 2010).

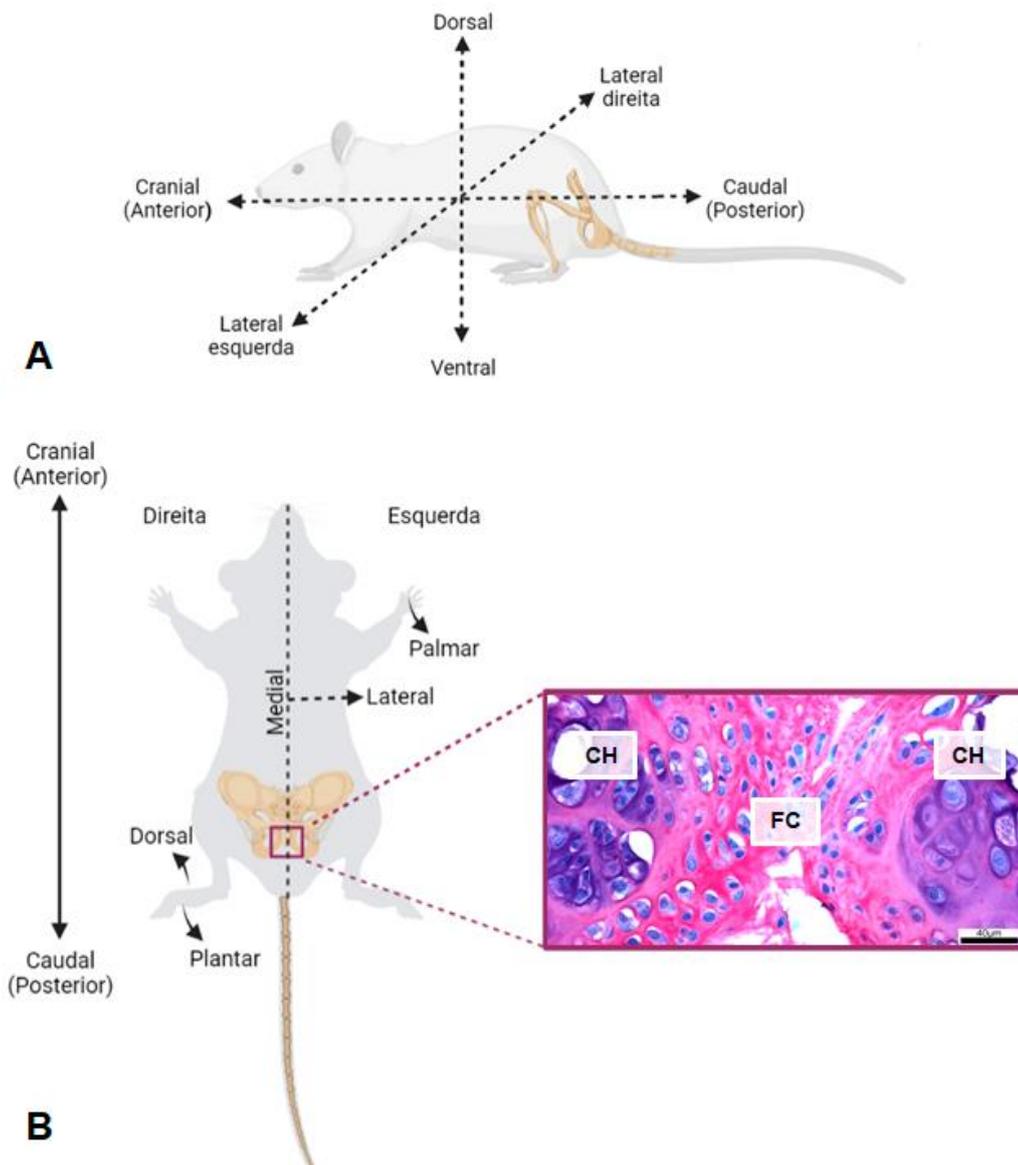


Figura 1. Representação esquemática da localização anatômica da sínfise púbica (SP) e da composição dos seus tecidos em camundongos. Em **A**, note os planos corporais em relação a localização da SP. Em **B**, na vista ventral, note a localização da SP em plano medial porção ventral do camundongo. Os tecidos que compõe a sínfise púbica estão representados na fotomicrografia: a fibrocartilagem (FC) entre os coxins de cartilagem hialina (CH). Sirius Red e Hematoxilina. Barra = 40µm. Imagem criada em BioRender.

1.3 Canal de parto: da sínfise púbica ao ligamento interpúbico

Em camundongos, a SP passa por modificações preparatórias durante o período inicial da prenhez. Até o 12º dia de prenhez (D12), a histoarquitetura do disco fibrocartilaginoso interpúbico, entre a cartilagem hialina dos ossos púbicos, é semelhante ao animal nulíparo. No entanto, a articulação aumenta de 0,15 a 0,2 mm entre o dia 12 e 15, com o desenvolvimento do ligamento interpúbico (Llp), induzido pela relaxina e pelo estrogênio (Zhao *et al.*, 1999 e 2000; Castelucci *et al.*, 2018; Moro *et al.*, 2012). Esse ligamento proporciona proteção ao canal de parto e permite a separação dos ossos púbicos resultando em uma gradual expansão de fibrocartilagem (Consonni *et al.*, 2012; Joazeiro *et al.*, 2014; Castelucci *et al.*, 2018). Assim, durante a prenhez, a sínfise púbica passa por modificações fisiológicas graduais denominados fases de separação e de relaxamento. Após a primeira prenhez, ocorre a fase de recuperação (Figura 2).

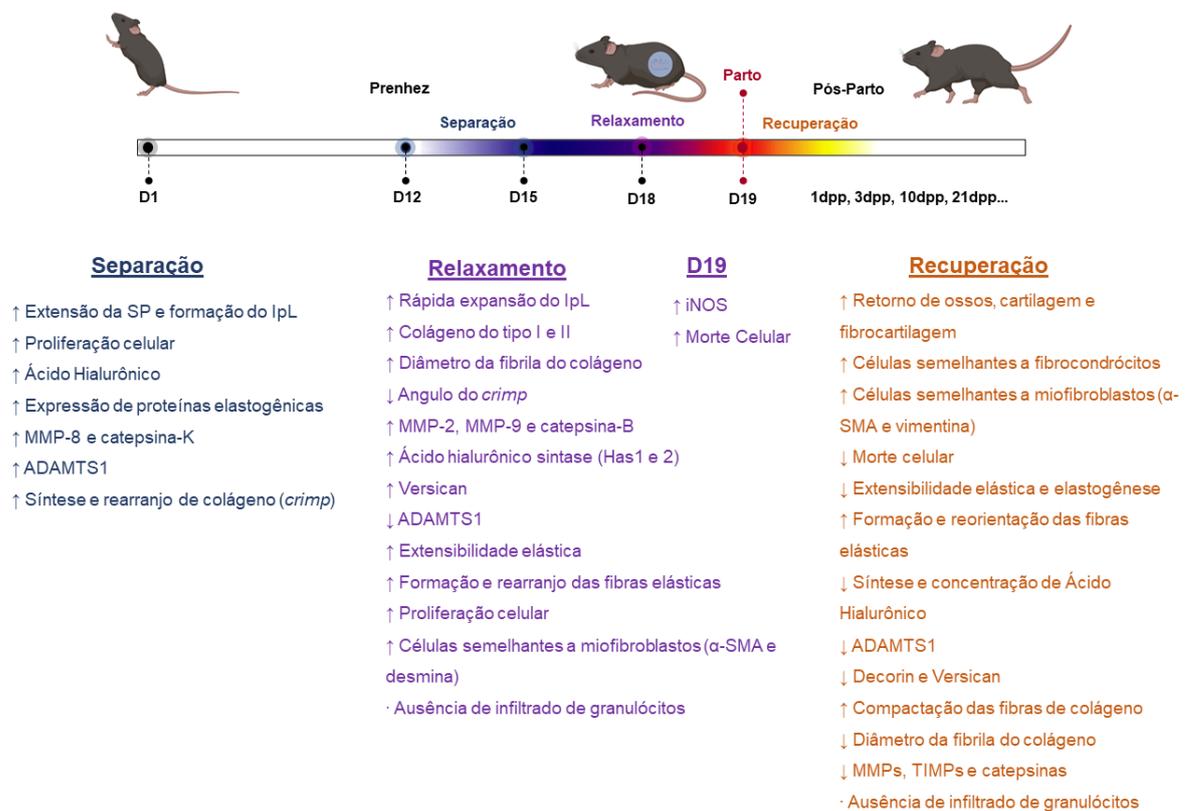


Figura 2. Representação esquemática das modificações fisiológicas graduais das fases de remodelação da sínfise púbica durante a prenhez e o pós-parto de camundongos. (Modificado de Joazeiro *et al.*, 2014). Imagem criada em BioRender.

O ligamento interpúbico, formado entre o D12 e o D15 da prenhez, em camundongos, requer a expansão gradual do tecido conjuntivo denso com a presença de fibroblastos, os quais se proliferam para formar o ligamento (Rosa *et al.*, 2012). No que diz respeito aos fenótipos celulares, durante a formação do ligamento interpúbico, ao longo da prenhez, Crelin (1969) destacou as modificações resultantes da expansão gradual dessa estrutura e sua

possível relação com as células condrocíticas da sínfise “liberando-se de suas lacunas” e adquirindo fenótipo semelhante ao de fibroblastos, como demonstrado ultraestruturalmente por Linck e colaboradores (1976). Os componentes da matriz extracelular (MEC) e as citocinas do tecido conjuntivo frouxo influenciam a diferenciação dos fibroblastos no ligamento interpúbico (Moraes *et al.*, 2004). O fator de crescimento transformador beta (TGF- β) leva à transdiferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, caracterizados como células grandes, contendo um retículo endoplasmático altamente desenvolvido e com a presença α -actina de músculo liso (α -SMA) (Tarbit *et al.*, 2018 e Weiskirchen *et al.*, 2019). Os miofibroblastos apresentam características tanto de fibroblastos como de fibras musculares lisas e podem ser observados durante o processo de cicatrização de feridas na pele, durante a fase de contração de ferida. Essas células no ligamento interpúbico podem auxiliar no processo de aproximação dos ossos pélvicos na articulação pubiana no pós-parto de camundongos (Moraes *et al.*, 2004).

Durante a formação do ligamento interpúbico ocorrem expressões reguladas espaço-temporal de vimentina, α -SMA e de desmina no citoesqueleto do miofibroblasto (Moraes *et al.*, 2004). A vimentina, apresenta a função de garantir a motilidade e a forma da célula, a α -SMA tem como função auxiliar na contração muscular e a desmina, por sua vez, integra o filamento intermediário do tipo III à membrana plasmática (Tarbit *et al.*, 2018). Estas células possuem reconhecida capacidade proliferativa (Veridiano *et al.*, 2007) e são capazes de aumentar significativamente a geração de óxido nítrico por meio da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida nos momentos que antecedem o parto (D19), contribuindo eficientemente ao relaxamento do ligamento interpúbico e à acomodação do canal do parto (Moro *et al.*, 2012).

A remodelação da sínfise e o relaxamento do ligamento interpúbico, durante a segunda metade da prenhez requerem o equilíbrio dinâmico, espaço-temporalmente regulado, entre a deposição e a degradação de MEC (Joazeiro *et al.*, 2014). Se por um lado, o rearranjo e a deposição de fibras colágenas grossas e fibras elásticas neo-formadas (Moraes *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2004 e Consonni *et al.*, 2012) e o aumento das concentrações de ácido hialurônico de alto peso molecular e de proteoglicanos como versican (Pinheiro *et al.*, 2004, Pinheiro *et al.*, 2005, Garcia, *et al.*, 2008 e Rosa *et al.*, 2011) contribuem para o suporte biomecânico durante a expansão máxima do ligamento; por outro lado, as elevações dos níveis de expressões de enzimas como as metaloproteinases MMP-8 (entre o D12 e o D15), MMP-2 e -9 (entre o D15 e o D19), responsáveis por influenciar a ativação do TGF- β ; catepsina B, inibidores teciduais de metaloproteases (TIMP-1 e -2), além da iNOS no D19 e da diminuição de ADAMTS (que degrada versican) desempenham papéis importantes na remodelação e no relaxamento do tecido interpúbico para a necessária acomodação do canal

de parto e o suporte às forças que atuam na articulação durante o parto (Rosa *et al.*, 2011; Moro *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2008 e Tarbit *et al.*, 2012).

Após o primeiro parto, o tecido fibrocartilaginoso é restaurado, e a articulação interpúbica rapidamente se fecha, aproximando-se das dimensões de um animal não prenhe (Consonni *et al.*, 2012 e Moraes *et al.*, 2004), provavelmente devido à expressão tempo-dependente de marcadores de linhagem condrocítica para recuperação com sucesso do tecido fibrocartilaginoso (Castelucci *et al.*, 2018). Por sua vez, em camundongos múltiparos senescentes, Consonni e colaboradores (2012) descreveram características celulares e extracelulares do ligamento interpúbico relacionadas a uma possível perda de capacidade de retorno tecidual no pós-parto, enquanto esse retorno é preservado no ligamento interpúbico de camundongos primíparos (Moraes *et al.*, 2004), os quais não foram submetidos ao estresse fisiológico da reprodução e à deterioração associada à idade em nível celular (Konigsberg *et al.*, 2007). Já em camundongos primíparos senescentes (380 dias de idade), um dia após o parto, há relato de redução na distância entre os ossos púbicos (Gardner, 1936), o que sugere que a sínfise púbica do camundongo primíparo senescente pode retornar aos aspectos similares do animal não prenhe, apesar da idade avançada.

1.4 A êntese

Ao final da prenhez, a partir de D15, em camundongos primíparos, uma estrutura de transição com gradações e com organização diferencial celular e dos componentes de MEC denominada de êntese desenvolve-se conectando o Llp aos ossos da pelve (Castelucci *et al.*, 2018). As ênteses são estruturas essenciais e presentes ao longo do corpo, as quais permitem a transdução mecânica das forças promovendo a estabilidade aos ligamentos, aos tendões e às cápsulas articulares (Benjamin *et al.*, 2004). Essa transdução mecânica é possível graças aos tecidos que compõe essa conexão robusta ao osso (Spalazzi *et al.*, 2013).

As ênteses podem ser categorizadas de acordo com o tipo de tecido presente no local de fixação ao osso, podendo ser o tecido conjuntivo denso ou o fibrocartilaginoso (Lu e Thomopoulos 2013; Benjamin e Ralphs 2001; Benjamin *et al.*, 2002). A êntese fibrosa é caracterizada pela presença de tecido conjuntivo denso que conecta o ligamento diretamente ao osso, enquanto a êntese fibrocartilaginosa apresenta zonas de transição de fibrocartilagem na interface ao osso (Benjamin *et al.*, 2000). Entretanto, há poucos dados na literatura sobre a êntese fibrosa, uma vez que as lesões são mais comuns em ênteses fibrocartilaginosas (Apostolakos *et al.*, 2014).

A êntese fibrocartilaginosa é marcada por gradações na estrutura e na composição da MEC, que dão origem às variações nas propriedades mecânicas através dessa interface (Dyment *et al.*, 2015; Schwartz *et al.*, 2012; Thomopoulos *et al.*, 2010). Essas gradações podem ser observadas em cortes histológicos (Wopenka *et al.*, 2009) e estão associadas às

propriedades mecânicas, nas quais o sítio de inserção suporta as tensões mecânicas e a transmissão da força ocorra facilmente de modo a evitar rupturas (Smith *et al.*, 2013). A êntese fibrocartilaginosa pode ser caracterizada por quatro zonas, conforme mostra a Figura 3.

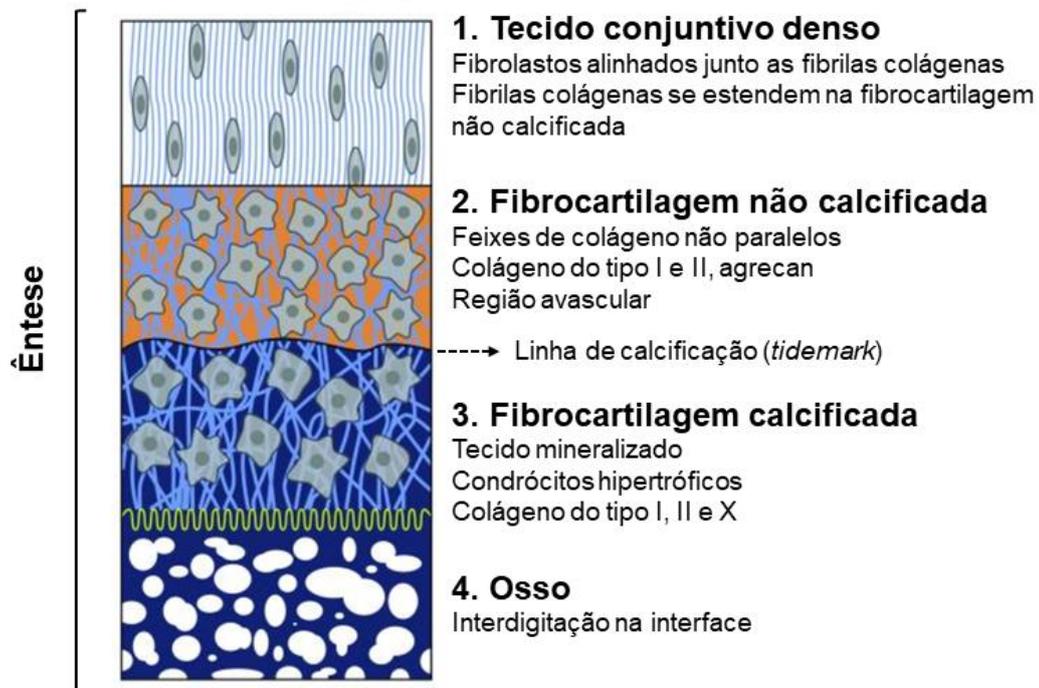


Figura 3. Representação esquemática das quatro zonas que compõe a êntese fibrocartilaginosa. (Modificado de: Yang e Temenoff, 2009).

1) **Tecido conjuntivo denso:** composto por fibrilas de colágeno do tipo I alinhadas paralelamente, nas quais encontram-se os fibroblastos que se estendem até a fibrocartilagem não calcificada. Nesta zona há presença dos proteoglicanos decorin e biglican.

2) **Fibrocartilagem não calcificada:** formada por fibrocondrócitos entre feixes espessos de fibras colágenas não alinhados. Nesta zona, há predominância de colágeno tipo II e agregcan, permitindo a resistência à compressão. Colágenos dos tipos VI, IX, X, XI e XII também são encontrados, a fim de fortalecer a conexão de inserção óssea, reduzindo o estresse na interface óssea. A transição entre a fibrocartilagem não calcificada e a calcificada é demarcada pela linha de calcificação (*tidemark*)

3) **Fibrocartilagem calcificada com tecido mineralizado:** formada por condrócitos hipertróficos e colágeno do tipo X.

4) **Osso:** formado por osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, cristais de fosfato de cálcio e fibras colágenas do tipo I mineralizadas. Nesta zona, há presença de interdigitação que fornece maior aderência entre a região de fibrocartilagem calcificada à interface óssea (Yang e Temenoff, 2009; Thomopoulos *et al.*, 2013).

Alguns fatores biológicos são necessários para o desenvolvimento, a homeostase, a remodelação e o reparo tecidual da êntese de tendões de camundongos, como a expressão

dos genes *RUNX-2*, *SOX-9*, *DCX*, colágeno do tipo II (*Col2a1*) e do tipo X (*Col10a1*) (Thomopoulos *et al.*, 2010). A expressão espaço-temporal desses genes muito se assemelha àquela encontrada no balanço da condrogênese e da osteogênese, como observada na ossificação endocondral (Bi *et al.*, 1999; Hattori *et al.*, 2010; Leung *et al.*, 2011 Mackie *et al.*, 2011 e Bahney *et al.*, 2015). O *Runx-2* (*Runt - related transcription factor 2*), quando expresso, contribui na diferenciação e na proliferação de osteoblastos. Além disso, o *Runx-2* é essencial para o crescimento endocondral e intramembranoso (Stein *et al.*, 2004). Enquanto o *Sox-9* (*SRY-Related High-Mobility Group Box 9*) atua em etapas de diferenciação de condroblastos e na formação de cartilagem, além de reprimir a transcrição de fatores da diferenciação de osteoblastos (Zhou *et al.*, 2006).

A expressão de *Sox-9* e *Runx-2* na êntese da articulação interpúbica coordena a diferenciação de células progenitoras osteocondrais, sendo o *Sox-9* expresso em condrócitos proliferativos (Castelucci *et al.*, 2018). Além disso, *Sox-9* e *Runx-2* regulam a expressão de *Dcx* (*doublecortin*), um gene expresso em condrócitos presentes na cartilagem articular, envolvido no comprometimento de linhagem celular condrocítica (Ge *et al.*, 2014). Outros estudos igualmente mostraram que muitos genes estão envolvidos diretamente com o *Sox-9* durante a diferenciação dos condroblastos, incluindo aqueles que participam na codificação de proteínas da MEC, de proteínas de membrana, e de fatores de transcrição e moléculas de sinalização. O *Sox-9* pode regular genes capazes de codificar proteínas presentes na MEC, como *Col2a1* que é responsável por codificar colágeno do tipo II, importante para diferenciação dos condroblastos, específico para tecidos cartilagosos (Stokes *et al.*, 2001; Yasuda *et al.*, 2017).

O gene *Col1a1* (colágeno do tipo I) é responsável pela expressão de um tipo de colágeno fibrilar, necessário para que haja o processo de ossificação, permitindo a deposição mineral na êntese (Shohan *et al.*, 2016). Já o gene *Col10a1* (colágeno do tipo X) é expresso em condrócitos hipertróficos. Estudos indicam que *Runx-2* está associado à ativação da expressão do colágeno tipo X, já que o *Runx-2* é expresso na ossificação endocondral na diferenciação dos condrócitos (Zheng *et al.*, 2003).

Diferentes fatores de transcrição estão envolvidos no processo de diferenciação dos condrócitos (Kozhemyakina *et al.*, 2015). O *Sox-9* está envolvido na diferenciação dos condrócitos por ativar marcadores de diferenciação e, na ausência do *Sox-9*, a condrogênese é inibida (Bi *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2002). No processo de ossificação endocondral, a ativação de *Sox-9* pode levar a inibição de β -catenina ativando a sinalização de *Runx-2* para diferenciação de condrócitos hipertróficos (Kozhemyakina *et al.*, 2015) (Figura 4).

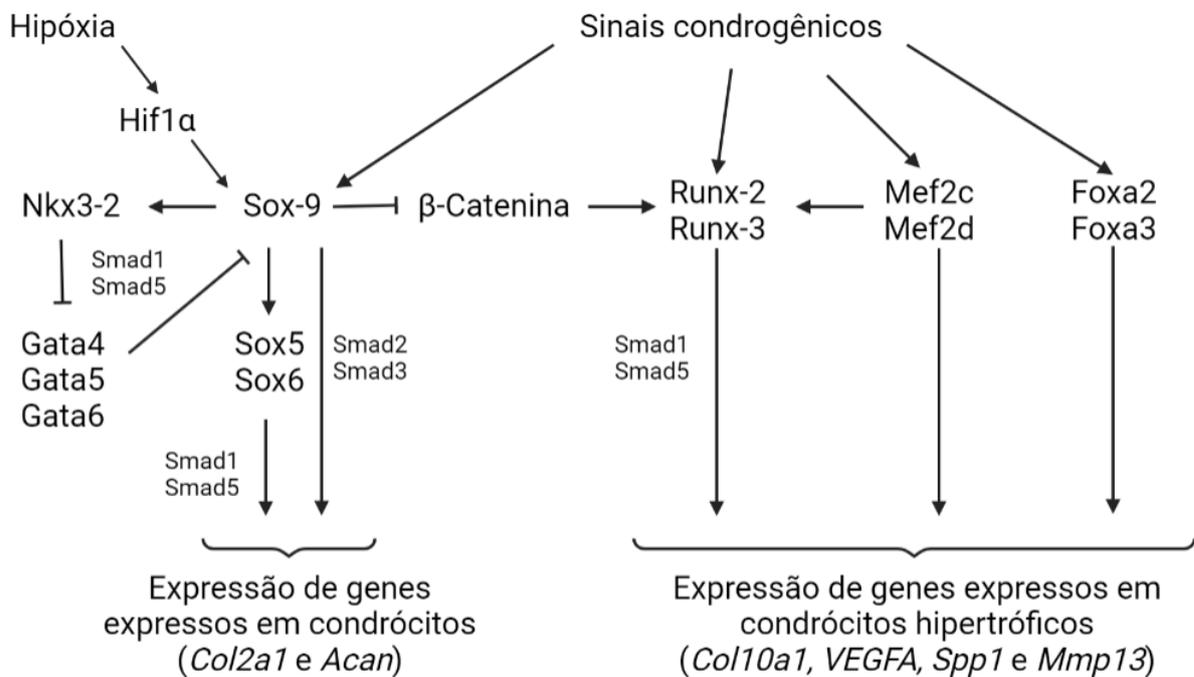


Figura 4. Fatores de transcrição expressos na via de sinalização durante a diferenciação de condrócitos e condrócitos hipertróficos no processo de condrogênese e ossificação endocondral (Modificado de: Kozhemyakina *et al.*, 2015).

Ainda, na ossificação endocondral, a sinalização de Sonic Hedgehog (*Shh*) induz as células mesenquimais a se diferenciarem em células da linhagem condrocítica. Esses condrócitos passam, então, por fases de proliferação, de crescimento, de hipertrofia e, com a expressão de *Runx-2*, de apoptose, sendo suas lacunas substituídas por vasos sanguíneos, células osteoprogenitoras e osteoblastos (Yang *et al.*, 2015; Berendsen *et al.*, 2015). O processo de ossificação endocondral é finamente regulado por genes e por fatores de transcrição, como o *Sox-9*, que além de estar expresso em condrócitos proliferativos, induz a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*), levando à invasão de vasos sanguíneos nas lacunas deixadas pelos condrócitos em apoptose (Berendsen *et al.*, 2015).

Deste modo, a expressão e a localização de todos esses fatores, regulados espaço-temporalmente, em cada zona da entese, leva às distintas expressões gênicas, o que resulta na formação de tecidos com gradações biomecânicas (Thomopoulos *et al.*, 2010), as quais, sob constante estresse mecano-fisiológico, auxiliam na transferência de forças resultantes de cisalhamento na sínfise púbica e na manutenção estrutural e fisiológica dessa articulação (Castelucci *et al.*, 2018).

1.5 A remodelação tecidual e a multiparidade

A fibrocartilagem presente na sínfise possui características adequadas para resistir às forças de cisalhamento e permitir a correta abertura da articulação no final da prenhez. Com

o desenvolvimento do Llp, as fibras de colágeno passam a apresentar ondulação (*crimps*) e as fibras elásticas recém depositadas são alinhadas paralelamente ao eixo principal da articulação, seguindo a orientação das células semelhantes a fibroblastos. O Llp garante o relaxamento do canal de parto e, após o primeiro parto, esse ligamento sofre remodelação rápida e se recupera, retornando a sua estrutura fibrocartilaginosa similar ao animal não prenhe (Consonni *et al.*, 2012; Joazeiro *et al.*, 2014).

Durante a remodelação da sínfise púbica há um equilíbrio dinâmico entre a proliferação das células, a morte celular programada e as alterações nos componentes da MEC (Joazeiro *et al.*, 2014). Em camundongos, tal remodelação decorre de alterações da MEC entre o equilíbrio da sua deposição e da sua degradação. As fibras colágenas, as fibras elásticas, o ácido hialurônico e os proteoglicanos são produzidos para contribuição da expansão e da flexibilidade do Llp. A modulação da degradação proteica na remodelação desse ligamento ocorre com a participação das enzimas colagenase, gelatinases, catepsinas e ADAMTS1 protease e seus inibidores, como o inibidor tecidual de metaloproteases-1 (TIMP-1) e TIMP-2, além da atividade de óxido nítrico sintetase (iNOS) (Rosa *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2004; Castelucci *et al.*, 2018).

O retorno da sínfise foi estudado até 40 dias pós-parto em camundongos primíparas, envolvendo a expressão de marcadores de cartilagem para o restabelecimento da fibrocartilagem e coxins de cartilagem hialina. Já em camundongos múltiparos senescentes, as características celulares e extracelulares do Llp são relacionadas à perda de capacidade de retorno tecidual no pós-parto (Consonni *et al.*, 2012), entretanto é desconhecida a expressão espaço-temporal de moléculas envolvidas no processo de condrogênese e de osteogênese na êntese, durante a remodelação tecidual na prenhez e no retorno pós-parto em camundongos múltiparos e senescentes. Assim, sendo o envelhecimento um dos fatores para a menor adaptação dos tecidos às suas funções (Freemont *et al.*, 2007) e que o parto é um dos fatores para o afastamento dos ossos púbicos para suportar a intensa força de tração (Schutz *et al.*, 2009), se faz necessário o estudo da expressão gênica e da imunolocalização de Shh, Sox-9, Runx-2, DCX e Col2a1, envolvidos classicamente no processo de osteogênese e condrogênese, a fim de avaliar o balanço homeostático da entese na remodelação da sínfise púbica de camundongos.

1.6 Modelo de estudo

Amostras de tecidos maiores são frequentemente necessárias para realizar experimentos biomecânicos de forma adequada, sendo difícil a realização de estudos longitudinais em pacientes, assim como as questões éticas envolvendo a aquisição de amostras humanas. Por isso, os modelos animais oferecem a oportunidade de se testar hipóteses em um ambiente controlado (Abramowitch *et al.*, 2009).

Os roedores são o modelo animal mais utilizado para pesquisa de POP e incontinência urinária (Abramowitch *et al.*, 2009). Os camundongos animais têm um ciclo estral com duração entre 2 e 5 dias e prenhez de aproximadamente 19 dias, dependendo dos fatores ambientais (Champlin *et al.*, 1973). Desta forma, esse modelo animal permite a avaliação de processos que normalmente levariam mais tempo em outras espécies. Além disso, os roedores senescentes sofrem uma diminuição na liberação de hormônios sexuais semelhantes às mulheres na menopausa. Sendo então mais esta uma vantagem para outros estudos de como a menopausa e os hormônios sexuais podem afetar as propriedades do assoalho pélvico (Abramowitch *et al.*, 2009).

O camundongo fêmea de matriz reprodutiva múltipara senescente oferece a oportunidade de compreender a contribuição dos tecidos conjuntivo e muscular na fisiopatologia da reprodução. Embora o mecanismo possa não ser o mesmo que a progressão natural e o desenvolvimento de prolapso em mulheres, o roedor pode fornecer informações sobre o remodelamento tecidual, o qual pode contribuir para investigações associadas ao POP. As matrizes reprodutivas, como modelo animal de estudo, apresentam sinais de senescência reprodutiva (aproximadamente 8 meses de idade), após seis a oito partos sequenciais com declínio na fertilidade (Yeh *et al.*, 2007). Portanto, esse modelo animal pode contribuir para pesquisas que investiguem as vias fisiopatológicas e moleculares da reprodução que permeiam as alterações do canal do parto em camundongos múltiparos senescentes ou geneticamente modificados. Ainda, o estudo das alterações durante a prenhez e o pós-parto que ocorrem em órgãos e em estruturas no canal do parto duro de camundongos múltiparos senescentes pode contribuir para futuras investigações relacionadas às modificações do canal de parto com o envelhecimento, fornecendo base para compreender disfunções dos mecanismos biológicos que modificam o sistema musculoesquelético e fornecer bases para compreensão do POP.

Assim, considerando a prevalência do POP associado ao número de partos e à idade, bem como a caracterização de modelo animal como as matrizes reprodutivas, nesse trabalho buscamos compreender os efeitos da paridade e da idade na condrogênese e na osteogênese na e êntese da sínfise púbica em camundongos primíparos e múltiparos senescentes durante a prenhez e o pós-parto.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Considerando o efeito significativo da remodelação tecidual da articulação interpúbica de camundongos C57BL6/6J durante a primeira prenhez e seu pós-parto, os quais levam a modificações na população das células e na MEC, o presente estudo teve como objetivo geral a avaliação dos efeitos da paridade e da idade na condrogênese e na osteogênese da êntese dessa articulação em camundongos durante o fim da prenhez e no pós-parto em animais primíparos e em múltíparos senescentes durante a sexta prenhez.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos, este estudo visou a:

2.2.1. Caracterização morfológica da população celular e da MEC na formação e no remodelamento da êntese na articulação interpúbica, por meio de microscopia de luz convencional e polarizada com as colorações de Tricrômico de Masson e Sirius Red, além de microscopia eletrônica de transmissão, para a análise ultraestrutural da êntese, em camundongos C57BL6/6J primíparos e múltíparos senescentes (matrizes reprodutivas) no 12º dia de prenhez (D12, grupo controle) e de animais dos grupos que compreendem o final da prenhez (D15 e D18) e o pós-parto (3dpp e 21dpp).

2.2.2. Avaliação da localização de marcadores de linhagem celular condrogênica e osteogênica, tais como, SOX-9, RUNX-2, DCX e COL2A1 na êntese da articulação interpúbica em camundongos C57BL6/6J primíparos e múltíparos senescentes durante o final da prenhez e no pós-parto por imuno-histoquímica.

2.2.3. Avaliação quantitativa da expressão de genes envolvidos no processo de condrogênese e de osteogênese (*Shh*, *Sox-9*, *Runx-2*, *DCX*, *Col2a1* e *Col10a1*) na articulação interpúbica por PCR em tempo real.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.1.1 Animais

Camundongos fêmeas virgens C57BL6/6J jovens de três meses de idade com massa corporal de 25-30g e fêmeas constituintes da matriz reprodutiva (6-8 partos) com aproximadamente 8-10 meses de idade, massa corporal de aproximadamente 50g, foram obtidas no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) – UNICAMP. Os camundongos múltiparos foram mantidos em repouso (40 dias) para que nenhuma influência de remodelação em curso após a prenhez tenha influência nos resultados. Os camundongos foram mantidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sob ciclo de 12 horas de luz e escuro e tiveram livre acesso à comida padrão e à água.

As fêmeas de matrizes reprodutivas se constituíram no grupo de múltiparas senescentes, enquanto as virgens constituíram o grupo de primíparas. A oportunidade de acasalamento foi providenciada a ambos os grupos, nos quais as fêmeas foram manejadas junto aos machos todas as segundas-feiras ao final da tarde e os “plugs” vaginais foram observados pelas manhãs entre 7h e 8h, sendo que o dia no qual o “plug” vaginal foi encontrado tornou-se o 1º dia de prenhez (D1). O nascimento foi esperado para o 19º dia de prenhez (D19). As sínfises ou ligamentos interpúbicos foram obtidos: D12 (controle), D15, D18, 3dpp e 21dpp, de primíparas e de múltiparas (Figura 5).

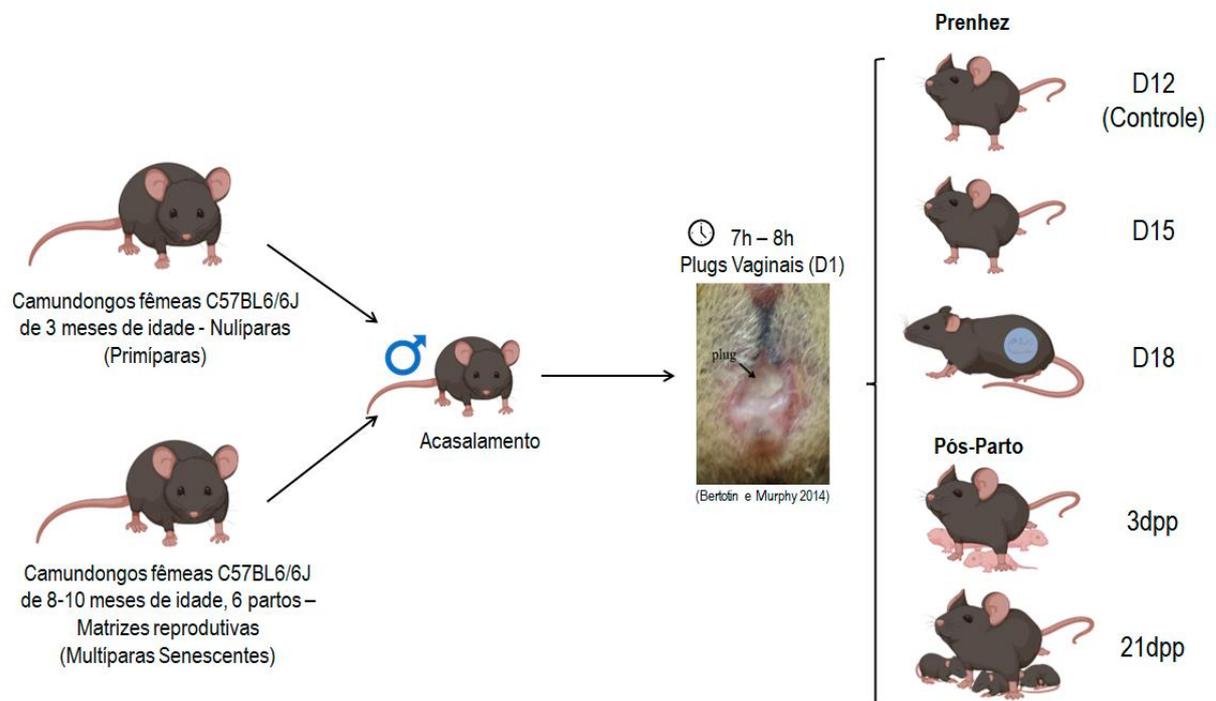


Figura 5. Representação esquemática do desenho experimental para o acasalamento e determinação dos dias para análises de estudo em camundongos fêmeas C57BL6/6J, nulíparas e múltiparas senescentes. Imagem criada em BioRender.

Foram utilizadas amostras de tecidos de ambos os grupos de cada dia de prenhez (tabela 1) para as técnicas de Microscopia de Luz, imuno-histoquímica, Microscopia eletrônica de transmissão e PCR em tempo real (Figura 6).

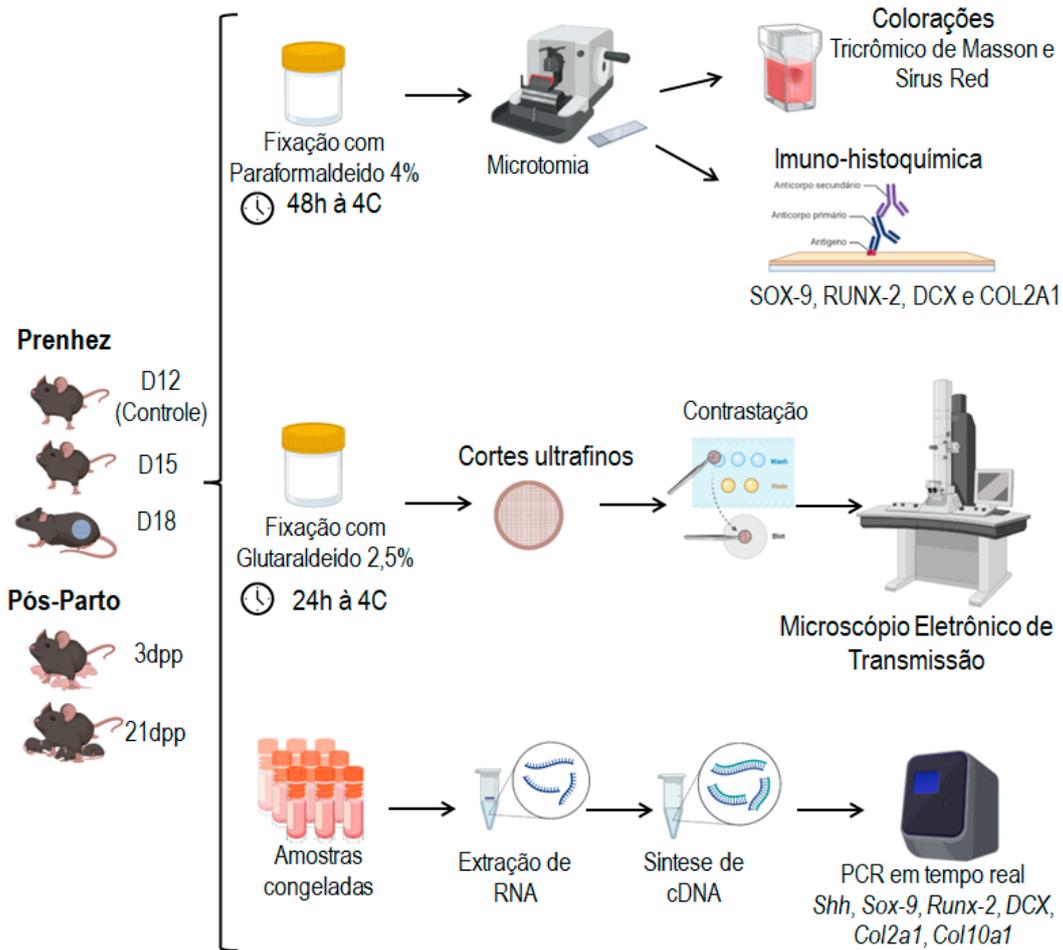


Figura 6. Representação esquemática das metodologias realizadas nos dias analisados para estudo em camundongos fêmeas C57BL6/6J, primíparas e múltiparas senescentes. Imagem criada em BioRender.

Tabela 1. Quantidade de animais utilizados em cada dia de estudo para realização das diferentes técnicas. Total de animais: 102 camundongos fêmeas.

Técnicas	Primíparas					Múltiparas				
	D12	D15	D18	3dpp	21dpp	D12	D15	D18	3dpp	21dpp
Microscopia de luz e Imuno-histoquímica	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
PCR em tempo real	6	3	3	3	6	6	3	3	3	6
Microscopia Eletrônica de Transmissão	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Os estudos foram conduzidos de acordo com “*The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (“*National Academy of Science 1996*”) e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IB/Unicamp), protocolo 5491-1.

3.1.2 Coleta de amostras teciduais

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina 10%: 100-200mg/kg e Cloridrato de Xilazina 2%: 5-16mg/kg, em seguida, foram sacrificados entre 11h e 12h. Após laparotomia, as porções mediais dos ossos púbicos com as sínfises púbicas ou ligamentos interpúbicos foram dissecadas e submetidos ao processamento adequado para as técnicas especificadas a seguir.

3.2 MICROSCOPIA DE LUZ CONVENCIONAL E POLARIZADA

Para os ensaios de microscopia de luz convencional e polarizada, as amostras de sínfises púbicas ou ligamentos interpúbicos das fêmeas primíparas e múltíparas foram fixadas por imersão em paraformaldeído 4% (Merck, Darmstadt, Germany) em solução-tampão de fosfato salino 0,1M (PBS, pH 7,4), durante 48h a 4°C. Em seguida, foram desidratadas em bateria de álcoois, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina (*Paraplast Kit embedding*, Sigma, St Louis, MO, EUA) a 58°C. Os cortes de 5µm foram corados, respectivamente, pelos métodos de Tricrômico de Masson (Kiernan, 1999) e Sirius Red (Montes, 1996). Os materiais foram documentados à microscopia de luz e polarizada em fotomicroscópio Eclipse 800 (Nikon, Japão), utilizando-se câmera digital P6FL PRO (Optika, Itália).

3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

3.3.1 Processamento das amostras

A fixação e o processamento para a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizados da seguinte forma: inicialmente as amostras teciduais de sínfises púbicas ou de ligamentos interpúbicos das fêmeas primíparas e múltíparas foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, recém diluído em tampão cacodilato (0,1M) e CaCl₂ (3mM) por 5 min à temperatura ambiente seguido por 24h em gelo. Após esse tempo, as amostras foram lavadas 3x de 5 min cada com tampão cacodilato (0,1M) e CaCl₂ (3mM) em gelo. Após as lavagens, as amostras foram incubadas em tampão cacodilato (0,1M), CaCl₂ (3mM), 0,5% de ácido tânico, por 1h em gelo. Em seguida, foi realizada a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato (0,1M) e CaCl₂ (3mM) e 0,8% de ferrocianeto de potássio por 1h em gelo. Amostras foram então lavadas com água milliQ 5x, por 5 min cada, em gelo e contrastadas *em bloc* com acetato de uranila 2% aquoso (filtrado antes do uso) *overnight* em geladeira.

No dia seguinte, as amostras foram lavadas com água milliQ 3x por 30 min cada em gelo e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (20%, 50%, 70%, 80%, 90% e 2x 100%), por 45 min cada. Foi realizada uma etapa adicional de etanol 100% à temperatura

ambiente (TA) por 45 min. Após as desidratações com etanol, foi realizada uma etapa adicional com etanol e acetona na proporção 1:1, seguida de duas etapas com acetona 100%, durante 45 min cada a TA. As amostras foram pré-embebidas em mistura de acetona e resina Epon 812 (*Electron Microscope Science*, Hatfield, PA) na proporção 3:1,1:1, 1:3 por 45 min cada. Em seguida, foram feitas três trocas de resina Epon pura de 1h em temperatura ambiente sob agitação, sendo a terceira *overnight*. No dia seguinte, foram feitas 2 trocas de resina Epon pura, sendo uma pela manhã e outra no final da tarde e os materiais biológicos foram então posicionados em moldes de silicone com resina pura, levados para estufa a 60°C por 72h para a polimerização completa.

Para o estudo morfológico e análise das amostras, foram obtidos cortes semi-finos (1 µm) corados a quente em solução de 0,5% de Azul de Toluidina (Kiernan, 1999). Em seguida, foram obtidos desse material cortes ultrafinos de 80nm em grades de cobre e contrastados com acetado de uranila e citrato de chumbo de Reynold's por 20 e 10 min, respectivamente. Os cortes ultrafinos foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) no Instituto de Biologia da Unicamp, assim como as elétrôn-micrografias obtidas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI Company).

3.3.1 Análises de morfometria

Para análise quantitativa das fibrilas de colágeno, campos aleatoriamente escolhidos na região da êntese foram registrados em aumento de 13000x para cada grupo. Os diâmetros de 120 fibrilas de colágeno aleatoriamente selecionadas de cada micrografia foram medidos, utilizando o programa Jiji ImageJ e um histograma foi obtido para cada grupo. O diâmetro médio da fibrila e o desvio padrão também foram calculados. As análises estatísticas entre os grupos foram obtidas por *One way ANOVA*, seguido do teste de Kruskal-Wallis.

3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

As amostras de sínfises púbicas de fêmeas primíparas e múltíparas foram coletadas e fixadas por imersão em paraformaldeído 4% (Merck, Darmstadt, Germany) em solução-tampão de fosfato salino 0,1M (PBS, pH 7,4), durante 48h a 4°C. Em seguida, foram desidratadas em bateria de álcoois, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina (Paraplast Kit embedding, Sigma, St Louis, MO, EUA) a 58°C.

Para realização dos ensaios de imuno-histoquímica, as lâminas *star frost* contendo os cortes de 5µm foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol, posteriormente foram incubadas em solução tampão citrato de sódio (pH 6,0 a 0,01M), para recuperação antigênica em micro-ondas durante 10 min, seguidos por 30

minutos de resfriamento. As lâminas foram retiradas do tampão citrato e os cortes foram delimitados com a caneta hidrofóbica PAP PEN (Sigma) e em seguida foram depositados aproximadamente 50µL dos meios de incubação que se sucedem.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com 0,03% peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em PBS 0,1M (pH 7,4) por 30 min, protegido de luz, à temperatura ambiente, seguido do bloqueio dos sítios inespecíficos com *Blocking Buffer* (1% albumina de soro bovino (BSA) em PBS 0,1M pH 7,4, Triton x-100 (0,02%) e glicina (50 mM)), por 30 min, protegido de luz, à temperatura ambiente. Após o bloqueio dos sítios inespecíficos, foram feitas 3 lavagens de 5 min com *Working Buffer* (1 parte de *Blocking Buffer* em 4 partes de PBS 0,1 pH 7,4). Em seguida, foram feitas as diluições dos anticorpos primários (tabela 2), em *Working Buffer* com incubação *overnight* em câmara úmida à 4°C.

Tabela 2. Anticorpos primários, com seus respectivos códigos e diluições utilizadas para o desenvolvimento da técnica de imuno-histoquímica.

Anticorpo primário	Marca	Diluição
Colágeno do tipo II policlonal	Invitrogen (PA5-85108)	1:100
Doublecortin policlonal	Invitrogen (PA5-80545)	1:100
SOX-9 policlonal	Invitrogen (PA5-81966)	1:100
RUNX-2 policlonal	Invitrogen (PA5-82787)	1:100

No dia seguinte, foram feitas 3 lavagens de 5 min cada à temperatura ambiente com *Working Buffer* e diluição do anticorpo secundário (tabela 3) com a mesma solução de lavagem, com incubação por 1h, à temperatura ambiente, em câmara úmida protegida de luz.

Tabela 3. Anticorpo secundário, com seu respectivo código e diluição utilizada para o desenvolvimento da técnica de imuno-histoquímica.

Anticorpo secundário	Marca	Diluição
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	Invitrogen (ab6721)	1:200

Passado o tempo da reação do anticorpo secundário, foi feita uma lavagem *Working Buffer* de 5 min à temperatura ambiente, seguidas de 3 lavagens de 5 min cada com TBS 0,1M (Tris-HCl 0,2M em salina 0,3M) pH 7,4 à temperatura ambiente, para posterior incubação com a solução reveladora peroxidase (Diaminobenzidina 0,04%, TBS 0,1M e H₂O₂) por 6 min à temperatura ambiente.

As amostras foram lavadas 3x com água miliQ e foi feita a contracoloração com Hematoxilina de Harry's (por 20s), seguido de lavagem de água de torneira, passando por

bateria de desidratação com concentrações crescentes de etanol, xilol, e montagem da lâmina em meio permanente (Entelan). Como controle negativo da reação, foi omitida a etapa de incubação do anticorpo primário. Os materiais foram documentados em fotomicroscópio Eclipse 800 (Nikon, Japan), utilizando-se câmera digital P6FL PRO (Optika, Itália).

3.5 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA: PCR em tempo real

3.5.1 Desenho de *Primers*

As sequências específicas de oligonucleotídeos para *Shh*, *Sox-9*, *Runx-2*, *DCX*, *Col2a1*, *Col10a1* e *36B4* (gene normalizador) foram obtidas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Então os primers foram desenhados com o auxílio do “*Primer – Blast*”, verificados pelo BLASTn e, assim, a confecção desses primers foi solicitada à empresa IDT (Tabela 4).

Tabela 4. Sequências dos oligonucleotídeos *Forward* (F) e *Reverse* (R) obtidos no *NCBI* e utilizados na quantificação da expressão gênica de *Mus musculus* por meio da técnica PCR em tempo real.

Gene	Sequência de Primers	Amplicon	Sequência de Referência NCBI
<i>36B4</i>	F: 5'- GACCACCAAGACATACGGGG-3' R: 5'- AGTGTGCGATGCTCTGGTAG-3'	196	NM_007927.3
<i>Shh</i>	F: 5'-CCCCTTTAGCCTACAAGCAGTTT-3' R: 5'- TTCTTGTGATCTTCCCTTCATATCTG-3'	86	NM_009170.3
<i>Sox-9</i>	F: 5'-TTCAGATGCAGTGAGGAGCA-3' R: 5'-TATCCACGGCACACACTT-3'	140	NM_011448.4
<i>Runx-2</i>	F: 5'- CCCAGCCACCTTTACCTACA-3' R: 5'- TATGGAGTGCTGCTGGTCTG-3'	449	NM_001146038.2
<i>DCX</i>	F: 5'- CCAAGAATGTCAACCCCAAC-3' R: 5'- TGTTCTCTCTGGCTTGAGCA-3'	104	NM_001110223.1
<i>Col2a1</i>	F: 5'- CATCGACATGTCAGCCTTTG-3' R: 5'- CGGATGCTCTCAATCTGGTT-3'	158	NM_031163.3
<i>Col10a1</i>	F: 5'- GGCTACCTGGATCAGGCTTC-3' R: 5'- ACTCAGAGGAGTAGAGGCCG-3'	95	NM_009925.4

3.5.2 Extração de RNA

As sínfises e os ligamentos interpúbicos foram removidos e imediatamente transferidos para nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas à -80°C. O RNA total das amostras foi extraído e isolado utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante com maceração de amostras em 1,0mL de Trizol nos eppendorfs, seguido por incubação de 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200µL de clorofórmio

(isento de RNase) a cada amostra, seguido de agitação durante 15s e incubação durante 3min à temperatura ambiente. Na sequência, o material foi centrifugado a 12000 G por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa transparente foi removida cuidadosamente para evitar contaminação por proteínas ou DNA genômico. Em seguida, à fase aquosa transparente, foi adicionado 500µL de isopropanol e as amostras foram incubadas durante 10 min a temperatura ambiente e, novamente, o material foi centrifugado a 12000 G durante 10 min a 4°C e detectada a formação de um *pellet* na parede do tubo. Após essa etapa, o sobrenadante foi removido e foi adicionado álcool etílico 70% a 4°C, a solução resultante foi centrifugada a 7000 G por 5 min a 4°C. Finalmente, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* permaneceu durante 15 min exposto ao ar para secar. Em seguida, o material foi reidratado com 20µL de água DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*). A avaliação da integridade das amostras RNA total foi obtida por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% na cuba horizontal, com corrente contínua a 100V durante 20 min. Após a verificação da extração por meio do gel de agarose, o RNA total foi quantificado com auxílio do NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) e as alíquotas dos materiais foram armazenadas a -80°C.

3.5.3 Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA, foi utilizado o *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, Maryland, EUA) conforme as instruções do fabricante, descritas brevemente: Foi adicionado 1µg de RNA total a 1µL de primer oligo(dT) e o volume final do produto de reação foi completada até 12µL de água DEPC. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 65°C por 5 min no termociclador. Em seguida, as amostras foram retiradas do termociclador e incubadas por 50 segundos em gelo e então para cada reação, foram adicionados 8µL da mistura contendo: 4µL de 5x *reaction buffer*, 1µL de *Ribolock Ribonuclease inhibitor* (20u/µL), 2µL de 10mM dNTP mix e 1µL de *RevertAid H Minus M-MuLV RT* (200 u/µL), completando o volume final da reação para 20µL. Em seguida, as amostras foram incubadas no termociclador (60 min a 42°C e 5 min a 70°C). As amostras foram quantificadas com auxílio do NanoDrop e armazenadas a -80°C.

Para verificar a integridade do cDNA recém-sintetizado, foi efetuada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para o primer do gene normalizador (36B4). As alíquotas para reação PCR foram compostas por 4,5µL de Mix PCR (1x tampão Taq DNA polimerase, dNTP 0,2mM, MgCl₂ 1,5mM), 1,25µL de DMSO, 2µL de cDNA, 2µL de primers F+R (10mM), 0,125µL de Taq, 15,125µL de água DEPC. Em seguida, as amostras foram incubadas no termociclador de acordo com o programa (tabela 5).

Tabela 5. Programa de ciclagem de temperatura para PCR.

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturação	95 °C	1min	30
Anelamento	57 °C	1 min	
Extensão	72 °C	30 s	
Extensão final	72 °C	10 min	1
	4 °C	∞	

A avaliação da reação da PCR foi feita por meio da eletroforese em gel de agarose a 2%, adicionando-se *loading dye 6x* (Sinapse) para monitoramento da migração das bandas no gel em cuba horizontal, com corrente contínua a 100V durante 30min com *ladder* de 100pb.

3.4.4 PCR em tempo real

Para cada reação foram utilizados 5µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 2µL de cDNA (200ng/uL), 3,5 µL de água *DEPC*, 0,5 µL de *primer F* (3mM) e 0,5uL de *primer R* (3mM) no seguinte programa: etapa 1 (1 ciclo: 50°C – 2min, 95°C – 10min), etapa 2 (45 ciclos: 95°C – 15s, 60°C – 1min). As reações de cada animal foram feitas em triplicata utilizando placa apropriada para o termociclador Applied Biosystems StepOne Plus, no Laboratório de Genômica e bioenergia (Genômica e Proteômica – LGE/DGMI/IB/UNICAMP). O gene normalizador (36B4) foi avaliado e padronizado previamente por Rosa *et al.*, 2011. Os resultados foram normalizados usando os valores de *Ct* (*threshold cycle*) do gene 36B4 da mesma placa. Para quantificar a expressão gênica relativa, foi utilizado o modelo matemático $2^{-\Delta\Delta Ct}$, considerando o grupo D12 como calibrador. Para validar os ensaios de PCR em tempo real, as curvas de eficiência e de dissociação foram confeccionadas previamente e ajustes de concentração de cDNA e *primers* foram efetuados previamente. A curva de eficiência foi calculada por meio da equação $E = 10(-1/slope)$, com valores resultantes acima de 0,90 para todos os genes.

3.4.5 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média ± erro-padrão. Os dados da expressão relativa dos genes foram comparados entre os grupos foram obtidas por *Two way ANOVA*, seguido pelo teste de Bonferroni. A significância estatística foi definida como, *p value* < 0,05 (*), *p* < 0,01 (**), *p* < 0,001 (***), *p* < 0,0001 (****).

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL NA ÊNTESE DA ARTICULAÇÃO INTERPÚBICA DURANTE A PREENHEZ

Para caracterizar as alterações histoarquiteturais na êntese da articulação interpúbica, foram realizadas análises sistemáticas da morfologia do tecido. As análises morfológicas da articulação interpúbica de camundongos fêmeas, durante a primeira prenhez, e de fêmeas múltiparas senescentes, durante a sexta prenhez, permitiram o reconhecimento de modificações espaço-temporalmente reguladas na histoarquitetura da êntese desses animais (Figuras 7-9). Durante a primeira prenhez, essas alterações estão associadas à formação do ligamento interpúbico e ao subsequente “relaxamento” dessa estrutura, desencadeando a “separação” dos ossos púbicos necessária ao parto a termo.

Em fêmeas primíparas, no D12, nota-se a presença de fibrocartilagem interposta entre os coxins de cartilagem hialina, os quais revestem o osso púbico (Figura 7A). A população celular no D12 é majoritariamente formada por grupos isogênicos de fibrocondrócitos, cuja ultraestrutura revela um citoplasma rico em membranas do retículo endoplasmático granular e um núcleo com cromatina descondensada (Figura 8A). Ademais, a birrefringência das fibras colágenas, sob microscopia de luz polarizada, permitiu evidenciar a disposição perpendicular das fibras em relação à abertura da articulação e a coloração amarelada e laranjada dessas fibras dispostas ao redor dos fibrocondrócitos (Figura 9A).

Por outro lado, em fêmeas múltiparas, no D12, a histoarquitetura tipicamente descrita na primeira prenhez mostra-se alterada. A articulação interpúbica deixa de apresentar os coxins de cartilagem hialina e a fibrocartilagem, mas apresenta a presença de êntese, a qual conecta os ossos púbicos ao Llp remanescente das sucessivas prenhez (Figura 7D). Na êntese dos animais múltiparos, observa-se a presença de células alongadas, com núcleo de cromatina pouco condensada e com prolongamentos celulares (Figura 8D). Essas células estão imersas em MEC rica em fibras colágenas de birrefringência variando de verde ao amarelo e com fibras organizadas, em sua maioria, paralelamente em relação à abertura do Llp (Figura 9D).

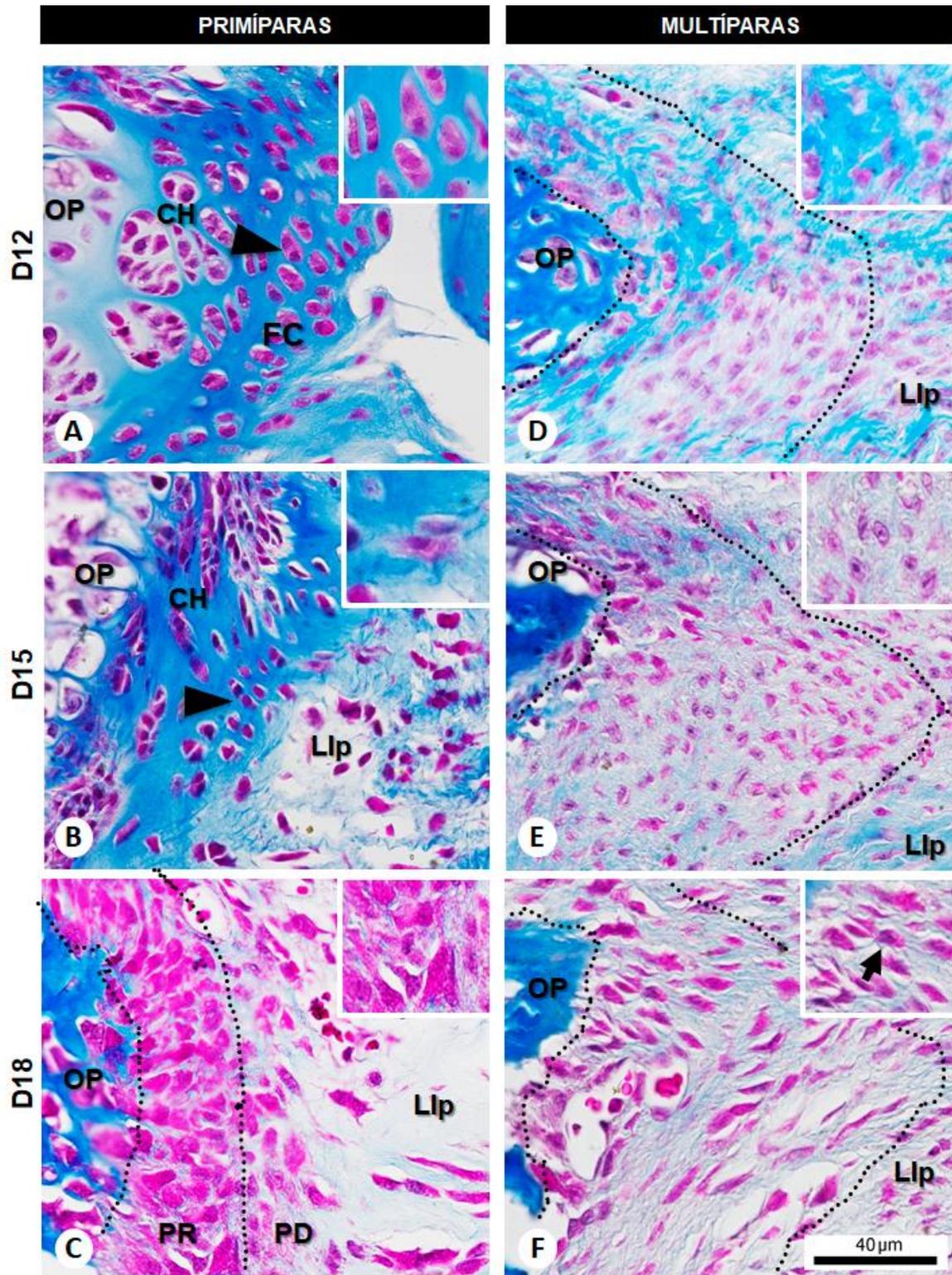


Figura 7. Fotomicrografias representativas das modificações teciduais da êntese na sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas (A, B e C) e em múltíparas senescentes (D, E e F) durante a prenhez. Em A, note a presença dos fibrocondrócitos (cabeça da seta) na matriz de fibrocartilagem (FC) interposta entre os condrócitos imersos na matriz extracelular (MEC) da cartilagem hialina (CH); note, no detalhe, o aspecto homogêneo intensamente corado em azul da MEC. Em B, perceba a orientação dos fibrocondrócitos (cabeça da seta) em direção ao tecido conjuntivo que constitui o ligamento

interpúbico (Llp) recém-formado; no detalhe, note o contraste entre a MEC homogênea com a fibrilar da MEC na transição do coxim de cartilagem em direção ao Llp. Em **C**, observe a presença de inúmeras células ovais próximas umas às outras na porção proximal (PR) e a presença de células alongadas e esparsas na porção distal (PD); no detalhe, perceba os prolongamentos das células na PR da êntese. As setas indicam a presença de vasos sanguíneos. Em **D**, note a presença da êntese com muitas células de citoplasma visível, imersas em MEC com fibras colágenas densamente arranjadas, as quais se encontram próximas ao OP (detalhe do canto superior direito). Em **E**, note a presença das células imersas em MEC fibrilar na êntese; observe, no detalhe, a organização fibrilar da MEC com delgadas fibras em diversas orientações. Em **F**, observe a presença das células na êntese imersas em MEC fibrilar (seta), com fibras colágenas frouxamente arranjadas, alinhadas na direção da abertura da articulação. Áreas demarcadas entre linhas pontilhadas (entre OP e LIP) correspondem à região aproximada da êntese. As setas indicam a presença de vasos sanguíneos. CH = Cartilagem Hialina; FC = Fibrocartilagem; Llp = Ligamento Interpúbico; PD = Porção Distal ao osso púbico; PR = Porção Proximal ao osso púbico; OP = Osso Púbico. Tricrômico de Masson. Barra de escala = 40µm.

No D15, durante a fase que corresponde à “separação” dos ossos púbicos em fêmeas primíparas, é possível observar o aparecimento gradual do Llp, em substituição à fibrocartilagem, com a redução dos coxins de cartilagem hialina (Figura 7B). Nesse dia de prenhez, as análises ultraestruturais mostram que a população celular de núcleo com cromatina descondensada deixa de apresentar morfologia típica de fibrocondrócitos e passa a ter morfologia alongada e alinhada à abertura dos ossos púbicos, semelhante ao fibroblasto, ainda com citoplasma proeminente e abundância de retículo endoplasmático granular (Figura 8B). Estas células semelhantes a fibroblastos estão imersas em MEC rica em fibras colágenas de birrefringência variando de amarelada à laranja, organizadas paralelamente à abertura da articulação interpúbica, onde é possível observar a formação de *crimps* (Figura 9B).

Em fêmeas múltíparas, no D15, assim como no D12, nota-se a aparente ausência de coxins de cartilagem hialina e de fibrocartilagem. No D15, é possível observar fibras colágenas mais espaçadas, que, acompanhado da sua menor afinidade pela coloração no tricrômico de Masson pode indicar maior quantidade de ácido hialurônico e/ou proteoglicanos associados às fibras colágenas (Figura 7E). A ultraestrutura das células imersas na MEC da entese evidencia a presença de células de formato alongado com projeções citoplasmáticas, cromatina descondensada e nucléolo evidente (Figura 8E). As fibras de colágeno na êntese possuem birrefringência predominantemente alaranjada, bem como evidencia a presença de *crimps* de colágeno na região (Figura 9E).

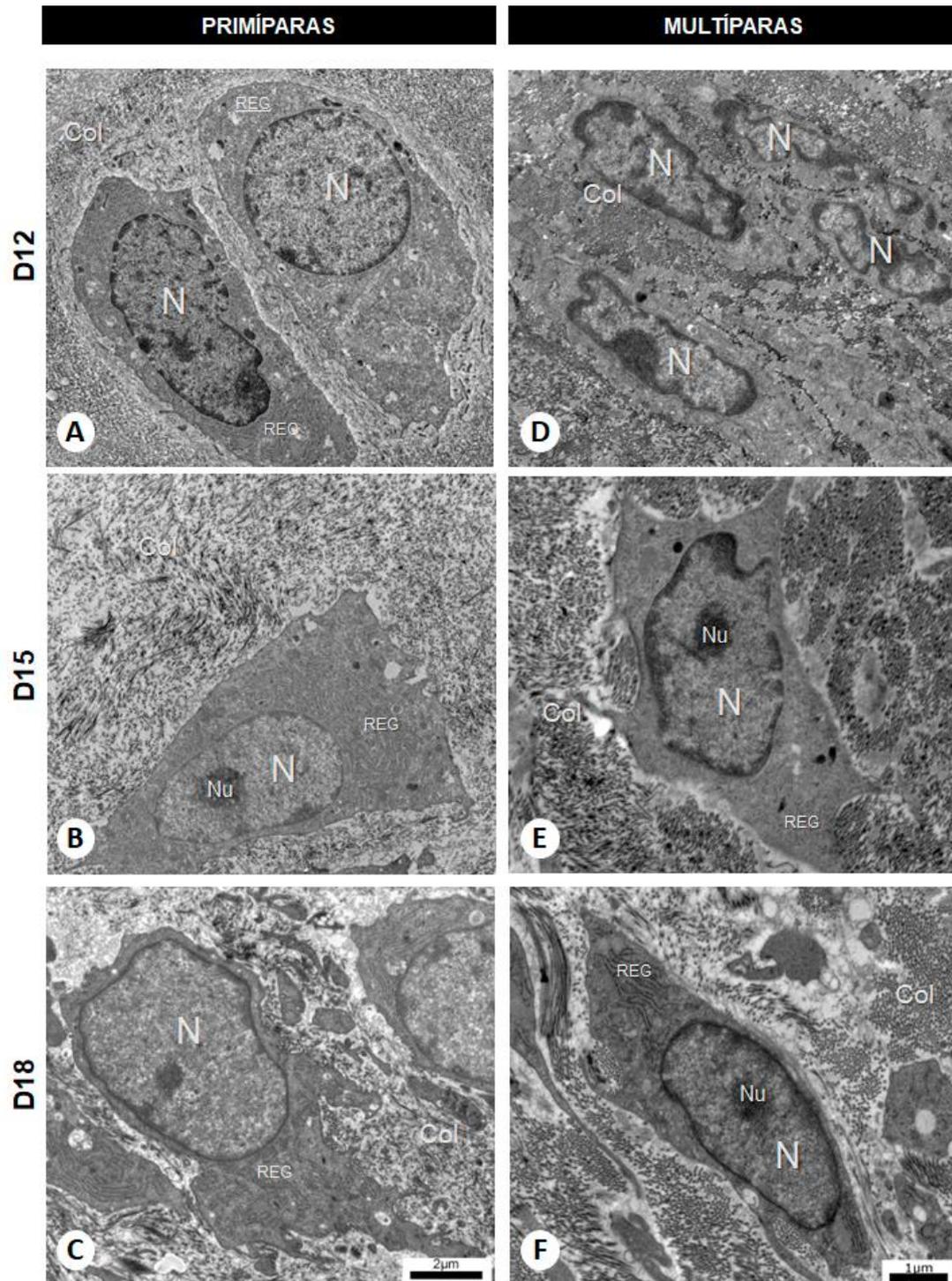


Figura 8. Elétron-micrografias representativas da população celular da êntese da articulação interpúbica em camundongos fêmeas primíparas (A, B e C) e múltiparas senescentes (D, E e F) durante a prenhez. Em A, note as características ultraestruturais do fibrocondrócito típico da fibrocartilagem, com núcleo (N) de cromatina pouco condensada. Em B e C, com a formação e o relaxamento do ligamento interpúbico, respectivamente, percebe as alterações no que diz respeito ao fenótipo mais alongado, projeções citoplasmáticas e maior desenvolvimento de organelas, como o retículo endoplasmático granular (REG), das células com o avançar da prenhez. Em D, observe as células distintas daquelas observadas durante a primeira prenhez, de perfil semelhante a fibroblastos, com

prolongamentos citoplasmáticos e núcleos elípticos, com heterocromatina perinuclear e nucléolo evidente. Em **E** e **F**, note as células semelhantes a fibroblastos com REG mais desenvolvido e núcleo com cromatina pouco condensada e nucléolo evidente. Em **A – F**, observe a MEC composta por fibrilas de colágeno, que com o avançar da prenhez tornam-se esparsas entre si. Col = Fibrilas de Colágeno; N = Núcleo; Nu = Nucléolo; REG = Retículo Endoplasmático Granular (REG). Microscopia Eletrônica de Transmissão. Barra A-C = 2 μ m. Barra D-F = 1 μ m.

Ao final da prenhez em animais primíparas, no D18, durante a fase de “relaxamento” do ligamento interpúbico, é possível observar a redução significativa da basofilia típica da MEC da cartilagem hialina e a presença da êntese fibrocartilaginosa contendo duas regiões de histoarquitetura distintas. Nessa estrutura, na porção proximal aos ossos púbicos (PR), há a presença de inúmeras células poliédricas, próximas entre si, com núcleo de cromatina descondensada, projeções citoplasmáticas e pouca MEC próxima. Enquanto, na porção distal aos ossos púbicos (PD), apesar de as células apresentarem características nucleares e citoplasmáticas semelhantes às da PR, apresentam formato mais alongados e estão mais esparsas e separadas entre si por maior quantidade de MEC. As células da PD não estão alinhadas paralelamente à abertura da articulação interpúbica, como observam-se as células semelhantes aos fibroblastos presentes no Llp (Figura 7C). A ultraestrutura de ambas as regiões da êntese mostraram células com a presença de retículo endoplasmático granular bem desenvolvido em seu citoplasma e núcleo com cromatina descondensada (Figura 8C).

No que diz respeito à MEC na êntese em D18, a análise de birrefringência de colágeno aponta uma transição gradual na organização das fibras de colágeno entre as porções da êntese e o Llp. Sob microscopia de luz polarizada, notam-se distintas birrefringência entre a PR e a PD, sendo as fibras colágenas da PR de coloração alaranjadas e as da PD, alaranjada/amareladas. Na PD, também é possível observar a presença de *crimps* na porção associada diretamente ao Llp, cuja birrefringência de colágeno é predominantemente esverdeada e a presença de *crimps* é significativa (Figura 9C).

Em fêmeas múltíparas no D18, a distinção entre as regiões que compõe a êntese é pouco evidente. Nota-se a presença de células de morfologia alongada e de MEC com aspecto fibrilar (Figura 7F). A ultraestrutura das células alongadas da êntese evidencia características de células ativas, com retículo endoplasmático bem desenvolvido e núcleo com cromatina descondensada, semelhante ao encontrado no mesmo dia de prenhez em fêmeas primíparas. Ainda, a ultraestrutura mostra a MEC com fibrilas colágenas esparsas e dispostas em direções distintas (Figura 8F). Esta MEC é composta majoritariamente de fibras colágenas de birrefringência predominantemente alaranjadas e alinhadas na direção da abertura da articulação, com a presença de *crimps* de colágeno na porção próxima ao Llp (Figura 9F).

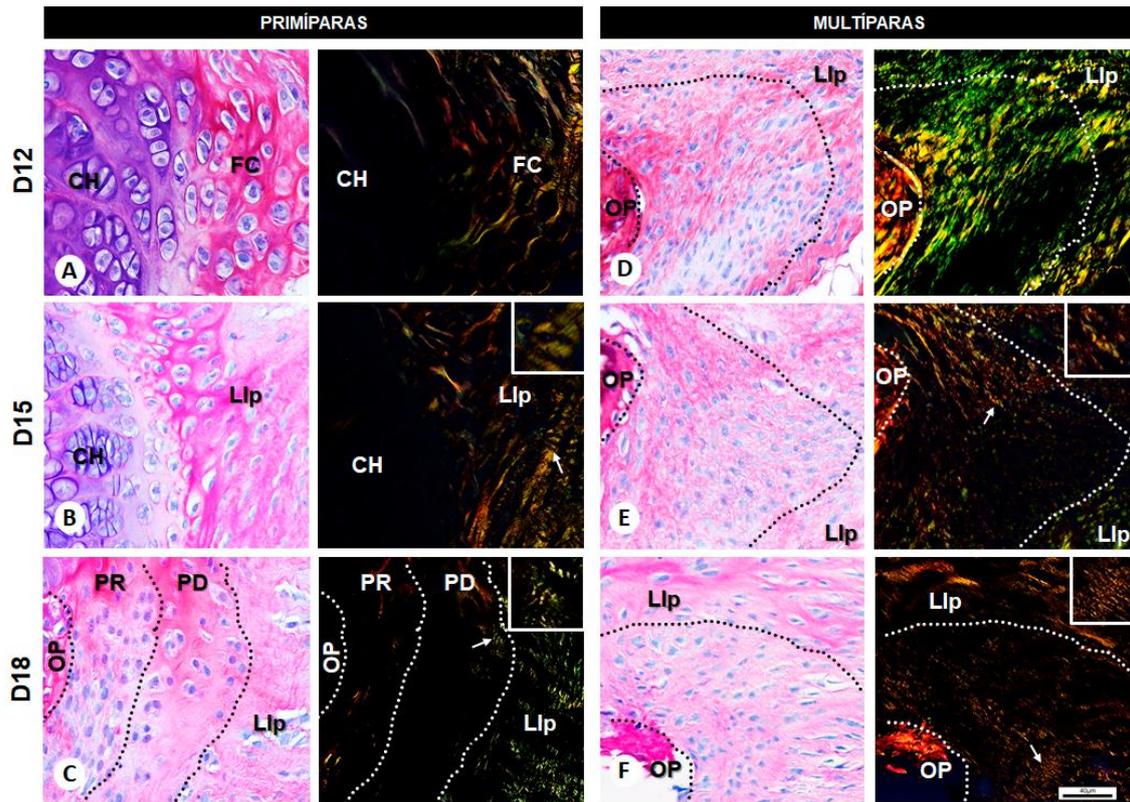


Figura 9. Fotomicrografias representativas da êntese na articulação interpúbica e da birrefringência das fibras colágenas, sob luz convencional e polarizada, durante o remodelamento tecidual da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas (**A**, **B** e **C**) e múltiparas senescentes (**D**, **E** e **F**) na prenhez. Em **A**, note a orientação perpendicular das fibras colágenas na fibrocartilagem (FC) em relação à abertura da articulação e a birrefringência ao redor dos fibrocondrócitos. Em **B**, observe a birrefringência e a orientação paralela das fibras colágenas, à medida que ocorre a formação do ligamento interpúbico (Llp), além da formação de *crimps*. Em **C**, perceba a transição da birrefringência na região da êntese, da porção proximal (PR) à porção distal (PD), à medida que as fibras colágenas se aproximam do ligamento interpúbico. Na PD, observe a presença de formação de *crimps* das fibras colágenas (setas). Em **D**, note a organização paralela das fibras colágenas na região da êntese, acompanhada de diferenças na birrefringência das fibras colágenas. Em **E**, observe birrefringência fibras colágenas na região da êntese e perceba a formação de *crimps* (seta). Em **F**, perceba com a birrefringência e a presença *crimps* (seta) das fibras colágenas. Áreas demarcadas entre linhas pontilhadas (entre OP e Llp) correspondem à região aproximada da êntese. CH = Cartilagem Hialina; FC = Fibrocartilagem; Llp = Ligamento Interpúbico; PD = Porção Distal ao osso púbico; PR = Porção Proximal ao osso púbico; PR = Porção Proximal ao osso púbico; OP = Osso Púbico. Sirius Red e Hematoxilina. Barra = 40µm.

4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL NA ÊNTESE DA ARTICULAÇÃO INTERPÚBICA DURANTE O PÓS-PARTO

Após o primeiro parto, a articulação interpúbica passa por adaptações para que haja a restauração gradual da histoarquitetura na sínfise púbica, com a reaproximação dos ossos púbicos há reorganização da matriz cartilaginosa e restabelecimento do fenótipo de células fibrocartilagosas. Enquanto nos animais múltiparos, após o sexto parto, essa reaproximação dos ossos púbicos parece não ocorrer. As análises dos aspectos morfológicos da articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltiparas senescentes durante o pós-parto permitiu a identificação de diferentes padrões morfológicos no remodelamento da êntese entre esses animais (Figuras 10-12).

Em fêmeas primíparas, no terceiro dia após o parto (3dpp), é possível diferenciar a êntese nas porções PR e PD dos ossos púbicos (Figura 10A). A PR apresenta alta densidade celular, com pouca matriz entre as células, as quais apresentam predominantemente morfologia alongada (perpendiculares à abertura da articulação), onde também é possível encontrar algumas células organizadas em grupos isógenos (detalhe da Figura 10A) indicando, nessa etapa, modificações para o restabelecimento da fibrocartilagem na articulação. Corroborando a presença de transições graduais entre tecidos, a ultraestrutura das células apresenta morfologia mais arredondada, com cromatina descondensada, assim como observado a microscopia de luz. Contudo, a ultraestrutura mostra a presença do retículo endoplasmático granular bem desenvolvido. No que diz respeito à organização das fibras colágenas, apesar das análises ultraestruturais apontarem o predomínio de delgadas fibrilas de colágeno dispersas em diversas direções em ambas as regiões da entese (Figura 11A), assim como em D18, observa-se uma transição gradual na organização das fibras de colágeno entre as porções da êntese e o Llp. Se na PR as fibras colágenas possuem birrefringência em cor verde, na PD, tais fibras adquirem cor amarelada/alaranjada à medida que se aproximam ao Llp. Em ambas as regiões, é possível observar a presença de *crimps* (Figura 12A).

A êntese das fêmeas múltiparas no 3dpp também apresenta alta densidade celular, mas com células de formato fusiformes e majoritariamente de cromatina descondensada e retículo endoplasmático granular pouco desenvolvido (Figuras 10C e 11C). A MEC apresenta-se mais compactada com feixes de fibrilas colágenas e elásticas (Figura 11C), bem como com fibras colágenas de birrefringência de cor predominantemente verde, com algumas regiões de coloração amarelada, onde é possível perceber a presença *crimps* (Figura 12C).

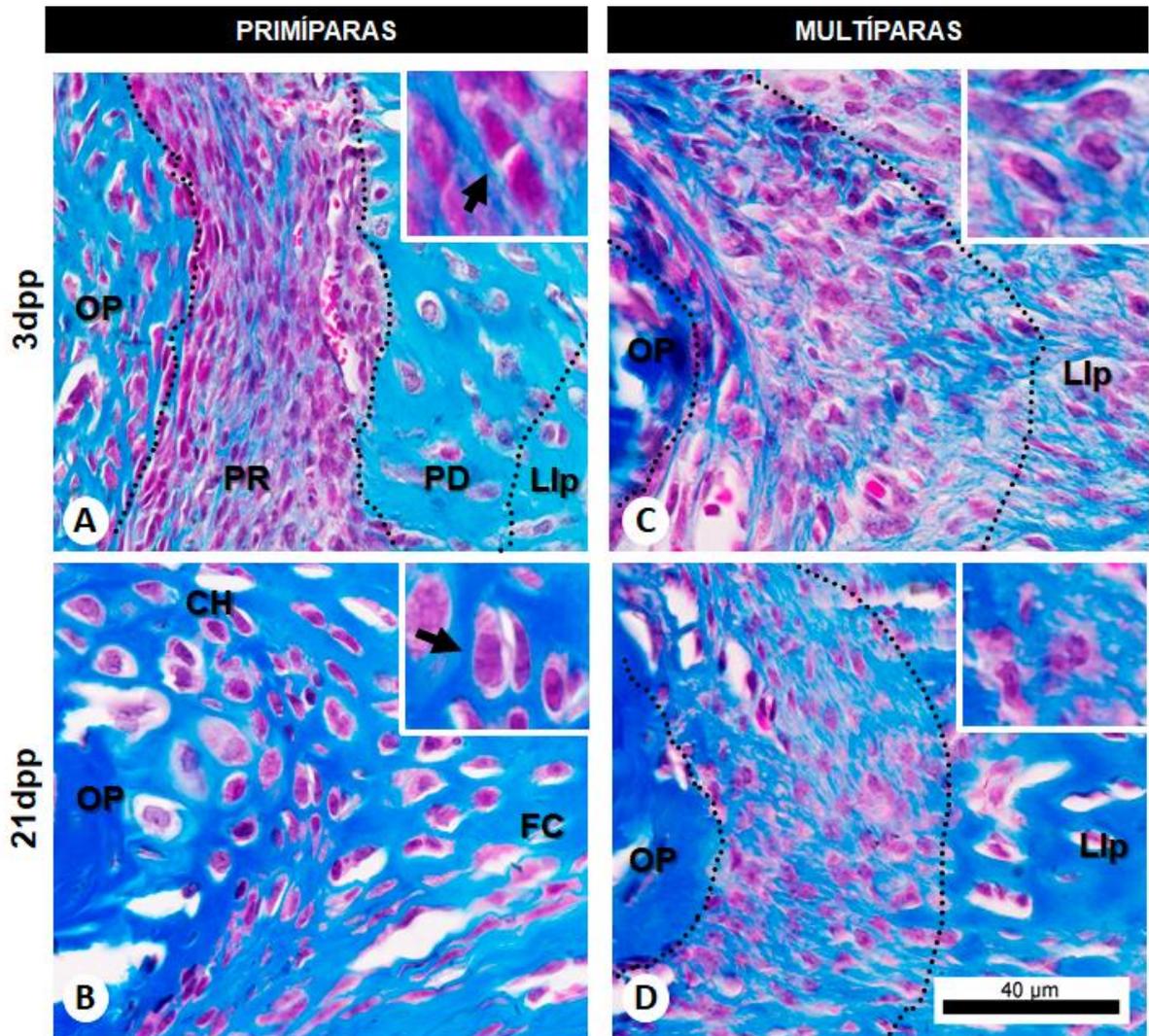


Figura 10. Fotomicrografias representativas do remodelamento tecidual da êntese na articulação interpúbica em camundongos fêmeas primíparas (**A** e **B**) e múltíparas senescentes (**C** e **D**) durante o pós-parto. Em **A**, note, na região da êntese na porção proximal (PR), a presença de inúmeras células alongadas próximo ao osso púbico (OP), e no detalhe, note o início da organização das células para formação dos grupos isógenos (seta) na PR, indicando o restabelecimento da fibrocartilagem na articulação. Na porção distal (PD), observe as células com morfologia mais arredondada, com cromatina descondensada. Em **B**, perceba a organização das células ao redor do osso púbico, em detalhe, os grupos isógenos (seta). Em **C** e **D**, observe, na região da êntese, a organização celular com orientação paralela à abertura da articulação, e nos detalhes em **C** e **D**, perceba a morfologia das células alongadas. Áreas demarcadas entre linhas pontilhadas (entre OP e Llp) correspondem à região aproximada da êntese. Llp = Ligamento Interpúbico; PD = Porção Distal ao osso púbico; PR = Porção Proximal ao osso púbico; OP = Osso Púbico. Tricrômico de Masson. Barra = 40µm.

No que diz respeito ao pós-parto de fêmeas primíparas no 21dpp, com a reaproximação dos ossos púbicos, as porções PR e PD da êntese não são distinguíveis, dando origem a tecidos semelhantes à cartilagem hialina e à fibrocartilagem observadas em animais no D12 (Figura 10B). Próximo ao osso púbico, observa-se a presença de grupos isógenos imersos em MEC com aspecto hialino (detalhe da Figura 10B). A ultraestrutura das células dessa região mostra a presença de características de células metabolicamente ativas, com amplo citoplasma, retículo endoplasmático granular desenvolvido, e com núcleo de cromatina descondensada. A MEC que circunda essas células apresenta feixes de fibrilas colágenas dispostas em diferentes direções (Figura 11B). Em relação às fibras colágenas, a microscopia sob luz polarizada mostrou sua birrefringência de coloração alaranjada ao redor das células semelhantes a fibrocondrócitos em fêmeas primíparas (detalhe da Figura 12B), semelhante ao encontrando no grupo de primíparas no D12.

Em fêmeas múltiparas no 21dpp, diferente do observado em primíparas, não ocorre o restabelecimento das porções cartilaginosas da articulação interpúbica. Nestes animais, ainda se observa a presença de êntese de porções de difícil distinção, sendo esta composta por células de citoplasma abundante e células de citoplasma reduzido, imersas em MEC com fibras colágenas densamente arranjadas (Figura 10D). A ultraestrutura destaca as diferenças entre as distintas populações celulares observadas ao microscópio de luz, detalhando que as células de citoplasma escasso também apresentam poucas organelas, o núcleo possui muita cromatina condensada em relação àquelas que possuem citoplasma abundante. A MEC ao redor dessas células, assim como em múltiparas com 3dpp, apresenta-se compactada com feixes de fibrilas colágenas e elásticas dispostas em diferentes direções (Figura 11D). As fibras colágenas apresentam birrefringência de coloração verde e amarelada (Figura 12D), indicando feixes de fibras colágenas mais espessos, quando comparados aos animais múltiparos no 3dpp (Figura 12C). É possível observar a presença de *crimps* na região da êntese (Figura 12D).

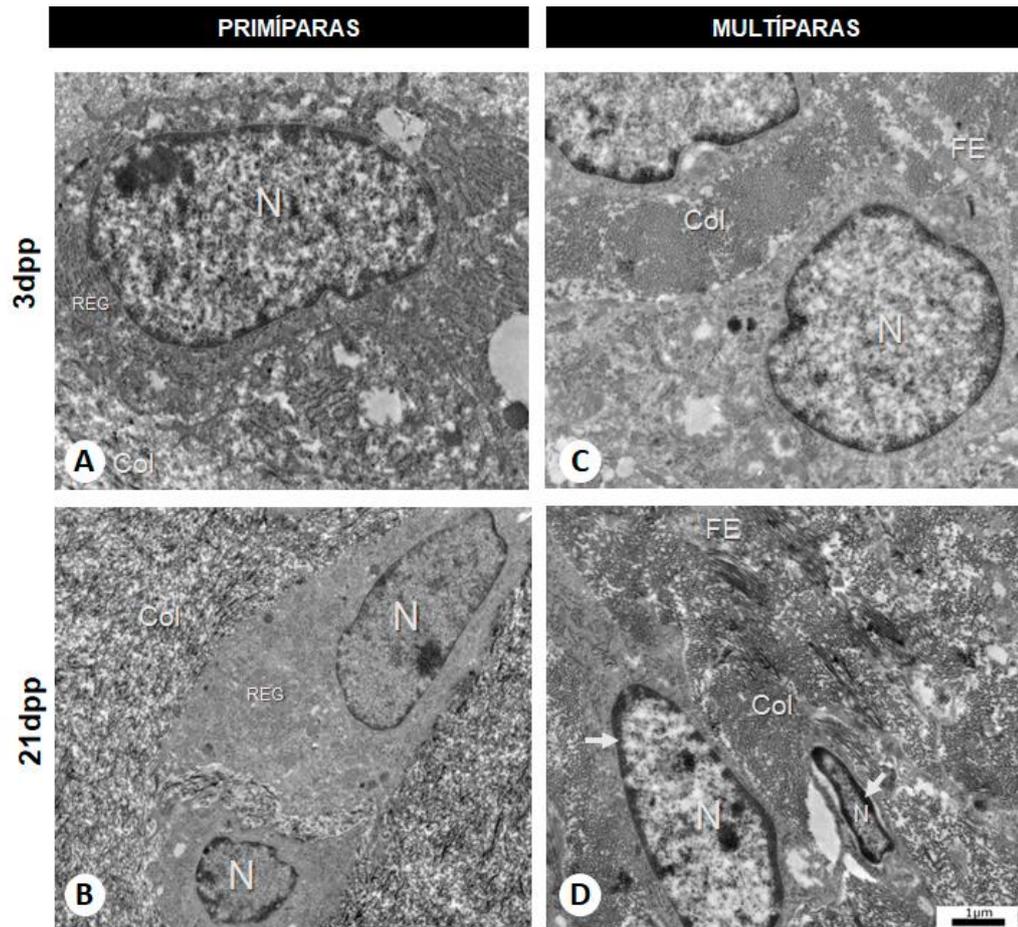


Figura 11. Elétron-micrografias representativas da população celular da êntese na articulação interpúbica em camundongos fêmeas primíparas (**A** e **B**) e múltíparas senescentes (**C** e **D**) no pós-parto. Em **A**, note a abundância de retículo endoplasmático granular (REG) e o núcleo (N) com cromatina descondensada. Em **B**, perceba a morfologia das células, semelhantes a fibrocondrócitos, com núcleo de cromatina descondensada e com citoplasma rico em REG. Em **C** e **D**, observe as células de morfologia alongada com citoplasma reduzido e de núcleo com mais cromatina descondensada. Em **D**, note a presença de grande porção de cromatina condensada associada ao envoltório nuclear (setas). Em **A** e **B** note a MEC composta por fibrilas de colágeno, e em **C** e **D** composta por fibrilas de colágeno e fibras elásticas. Col = Fibrilas de Colágeno; FE = Fibras Elásticas; N = Núcleo; REG = Retículo Endoplasmático Granular. MET. Barra = 1µm.

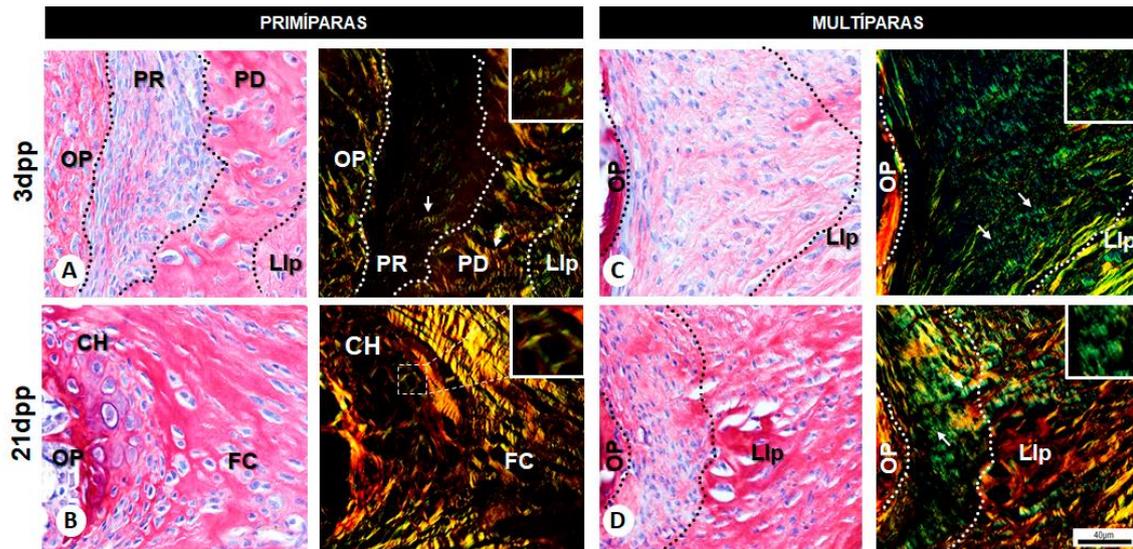


Figura 12. Fotomicrografias representativas da articulação interpúbica e da birrefringência das fibras colágenas, sob microscopia de luz polarizada, durante o remodelamento tecidual da êntese na sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas (**A** e **B**) e múltíparas senescentes (**C** e **D**) durante o pós-parto. Em **A**, note a transição birrefringente das fibras colágenas na porção proximal dos ossos púbicos (PR) para a porção distal dos ossos púbicos (PD). Em **B**, perceba, no detalhe, a birrefringência ao redor das células próximas ao osso púbico, na cartilagem hialina (CH) reestabelecida. Na região da êntese, em **C**, no detalhe, observe a coloração esverdeada/amarelada na birrefringência das fibras colágenas. Em **D**, note a birrefringência das fibras colágenas compactas da entese. Em **A**, **C** e **D** as setas indicam *crimps*. Áreas demarcadas entre linhas pontilhadas (entre OP e LIP) correspondem à região aproximada da êntese. CH = Cartilagem Hialina; Llp = Ligamento Interpúbico; PD = Porção Distal ao osso púbico; PR = Porção Proximal ao osso púbico; OP = Osso Púbico. Sirius Red. Barra = 40µm.

4.3 ANÁLISE DO DIÂMETRO DAS FIBRILAS COLÁGENAS NA ÊNTESE DA ARTICULAÇÃO INTERPÚBICA DE ANIMAIS PRIMÍPAROS E MULTÍPAROS SENESCENTES DURANTE A PREENHEZ E O PÓS-PARTO

A fim de investigar o processo de remodelação tecidual na êntese da sínfise púbica, as análises morfométricas realizadas a partir da microscopia eletrônica de transmissão permitiram observar a distribuição da frequência dos diâmetros das fibrilas colágenas na êntese da articulação interpúbica de fêmeas primíparas e de múltíparas senescentes após o sexto parto (Figura 13). No grupo das fêmeas primíparas e múltíparas senescentes, durante a prenhez e o pós-parto, as eletron-micrografias acompanhadas dos histogramas da distribuição das frequências dos diâmetros das fibrilas mostraram diferenças significativas entre os grupos.

Entre os grupos analisados, tanto em primíparas quanto em múltíparas, o grupo com fibrilas mais grossas foi encontrado ao final da prenhez, em D18. Em primíparas, o diâmetro das fibrilas apresenta-se entre 1nm e 60nm, enquanto as fêmeas múltíparas apresentam diâmetro das fibrilas entre 30nm e 105nm.

As comparações entre as médias dos diâmetros das fibrilas colágenas dos diferentes grupos durante e após a prenhez (D15 vs. D12; D18 vs. D15; 3dpp vs. D18; e 21dpp vs. 3dpp) demonstram a existência de uma diferença significativa entre cada um desses grupos, mostrando que a remodelação da MEC na entese da sínfise púbica ocorre em animais primíparas e em múltíparas (Figura 10K). A distribuição do diâmetro das fibrilas de colágeno nas fêmeas primíparas e múltíparas senescentes durante a prenhez e o pós-parto também pode ser apresentada por gráfico *box plot*, uma ferramenta estatística descritiva para representar a variação dos dados observados nos diâmetros das fibrilas de colágeno por meio de mediana, quartis, máximo, mínimo e *outliers* (Figura 13L).

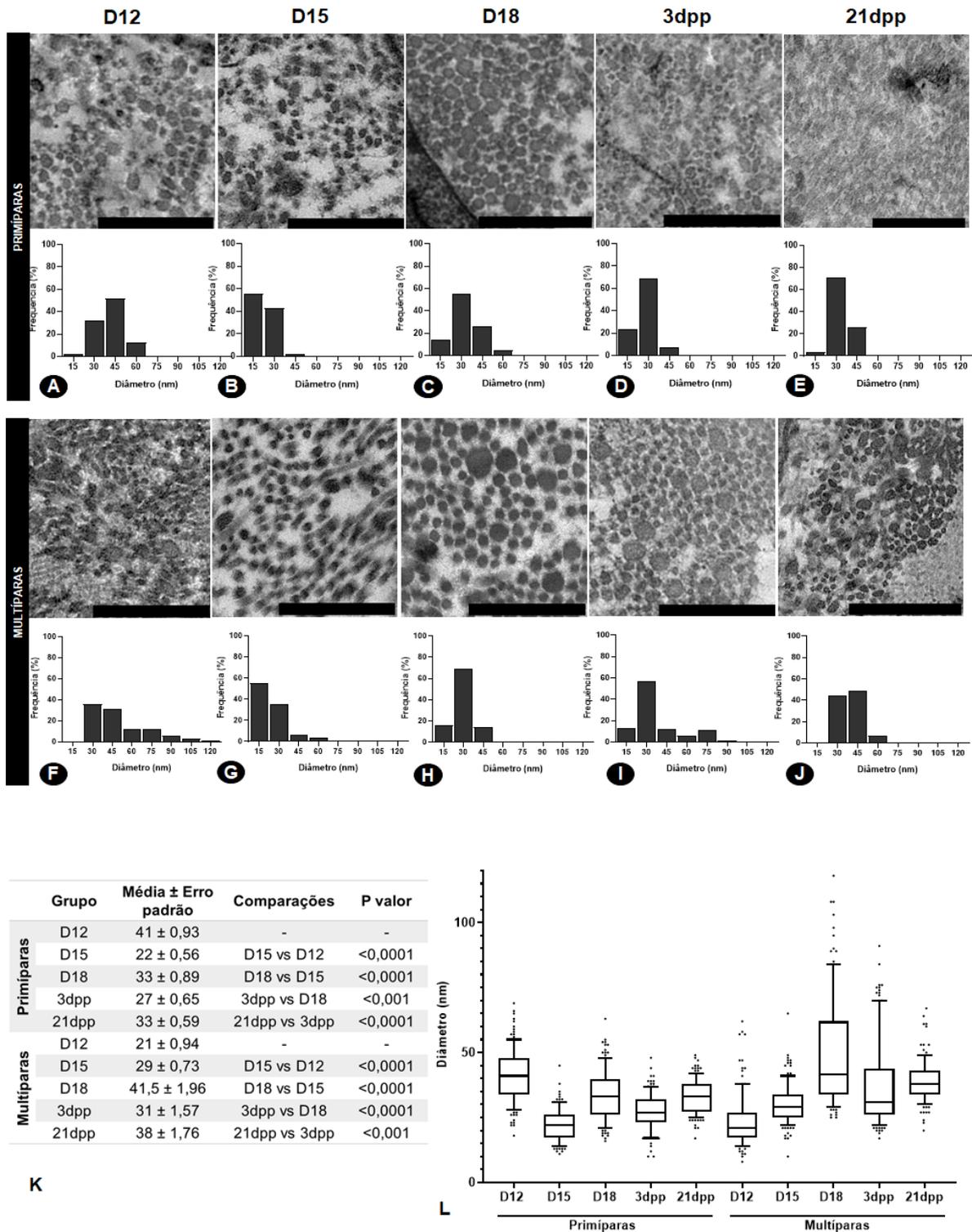


Figura 13. Eletron-micrografias representativas da secção transversal das fibrilas colágenas e histogramas dos intervalos da distribuição das frequências do diâmetro das fibrilas da êntese na sínfise púbica de fêmeas primíparas (A-E) e múltiparas senescentes (F-J), durante a prenhez e o pós-parto. Tabela com a média e o erro-padrão dos diâmetros das fibrilas por grupo (K) e *box plot* dos diâmetros das fibrilas de colágeno (L). *One way ANOVA*, seguido do teste de Kruskal-Wallis. MET. Barra A-J = 0,5µm.

4.4 ANÁLISE MOLECULAR E DA IMUNOLocalIZAÇÃO DE MARCADORES CONDRÓGENICOS E OSTEOGÊNICOS NA ARTICULAÇÃO INTERPÚBICA E NA ÊNTESE DE ANIMAIS PRIMÍPAROS E MULTÍPAROS SENESCENTES DURANTE A PREENHEZ E O PÓS-PARTO

Para avaliação do processo de condrogênese e osteogênese durante a remodelação da êntese da sínfise púbica de animais primíparos e múltiparos senescentes durante a prenhez e pós-parto, foram utilizados genes e proteínas, como o colágeno do tipo II, predominante na cartilagem hialina (Cheah *et al.*, 1991); *DCX*, expresso em condrócitos articulares (Ge *et al.*, 2014), *Sox-9*, essencial para a diferenciação dos condroblastos (Zhou *et al.*, 2006), *Runx-2*, envolvido na diferenciação e proliferação de osteoblastos (Stein *et al.*, 2004), colágeno do tipo X, encontrado em condrócitos hipertróficos (Zheng *et al.*, 2003) e *Shh*, cujo o gene é responsável pela indução das células mesenquimais a se diferenciarem em células da linhagem condrocítica (Yang *et al.*, 2015).

Desta forma, a avaliação molecular para expressão de *Col2a1* (Figura 14), *DCX* (Figura 17), *Sox-9* (Figura 20), *Runx-2* (Figura 23), *Col10a1* (Figura 26) e *Shh* (Figura 27) na articulação interpúbica e a imunolocalização dos marcadores condrogênicos e osteogênicos: Colágeno do tipo II (COL2) (Figuras 15 e 16), Doublecortin (DCX) (Figuras 18 e 19), SOX-9 (Figuras 21 e 22) e RUNX-2 (Figuras 24 e 25) na êntese mostraram perfis de expressão gênica relativa espaço-temporalmente reguladas distintas entre fêmeas primíparas e múltiparas senescentes durante a prenhez e o pós-parto. Os controles negativos foram realizados em todas as reações (Anexo 1 – Figura 29).

A análise da expressão de *Col2a1* (Figura 14) na articulação interpúbica, no grupo dos animais primíparos, quando comparados ao grupo controle (D12), mostra que no D15 há aumento significativo em sua expressão gênica, resultando no maior nível de expressão entre os grupos analisados. Enquanto no D18 há redução significativa. Já os grupos no 3dpp e no 21dpp não apresentaram diferenças significativas quando comparado ao grupo D12. Contudo, a comparação de D18 vs. D15 mostra redução significativa na expressão gênica relativa; entretanto há o restabelecimento da expressão gênica semelhante ao nível encontrado em D12, a partir do aumento significativo em 3dpp quando comparado ao D18.

A expressão de *Col2a1* na articulação interpúbica de fêmeas múltiparas mostra um padrão diferente do encontrado nas fêmeas primíparas. Não há diferenças significativas entre os dias de prenhez, quando em comparação ao D12 múltiparo. Durante o pós-parto, o grupo no 3dpp apresentou aumento significativo da expressão de *Col2a1* quando comparado ao D12 e ao D18. Comparações dos mesmos dias de prenhez e pós-parto entre o grupo de animais múltiparos e primíparos, mostra redução

significativa da expressão gênica de *Col2a1* em D12, D15 e 21dpp nos animais múltiparos.

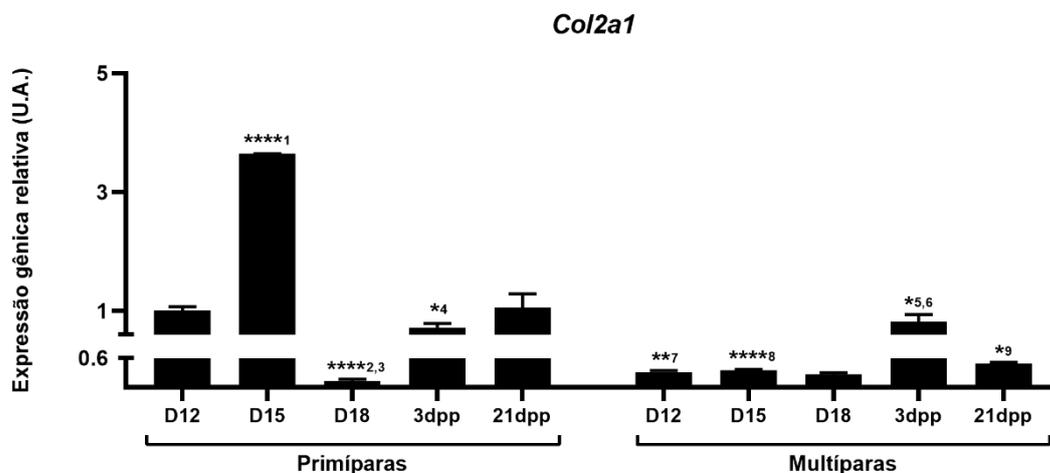


Figura 14. Representação gráfica da expressão gênica de colágeno do tipo II (*Col2a1*) na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltiparas senescentes durante a prenhez e pós-parto. As análises entre os grupos foram obtidas por *Two way ANOVA*, seguido pelo teste de Bonferroni. Significância, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Primíparas = ¹D15 vs. D12; ²D18 vs. D12; ³D18 vs. D15; ⁴3dpp vs. D18; Múltiparas = ⁵3dpp vs. D12; ⁶3dpp vs. D18; Múltiparas vs. Primíparas = ⁷D12 M vs. D12 P; ⁸D15 M vs. D15 P; ⁹21dpp M vs. 21dpp P. PCR em tempo real. U.A. = Unidade arbitrária. N = 3.

A análise da imunolocalização através da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) de colágeno do tipo II especificamente na êntese de animais primíparas no D12 evidencia a marcação citoplasmática dos condrócitos e condrócitos hipertróficos da cartilagem hialina, e discreta imunomarcação em fibrocondrócitos (Figura 15A). Enquanto no grupo das múltiparas senescentes, foram encontradas poucas células na região da êntese com ligeira imunomarcação citoplasmática (Figura 15D).

Em D15, no grupo das fêmeas primíparas, além da intensa imunomarcação dos condrócitos hipertróficos da cartilagem hialina, observa-se discreta imunomarcação nos fibrocondrócitos (Figura 15B). Embora seja o mesmo dia de prenhez, no grupo das múltiparas, foi observada pouca imunomarcação na MEC da êntese, em continuidade ao Llp (Figura 15E).

Ao final da prenhez, em D18, no grupo de animais primíparas, a imunomarcação de colágeno do tipo II ocorreu principalmente no citoplasma das células da PR, porém também pode ser observada na MEC da PR e da PD (Figura 15C). Entretanto, nos animais múltiparos, enquanto o citoplasma da população celular da êntese de D18 mostrou-se pouco marcada, ocorreu acentuada imunomarcação da MEC dentre os dias D15 para D18 (Figura 15F).

No pós-parto, no grupo das primíparas no 3dpp, a imunomarcagem de colágeno do tipo II foi mais evidente em células da PR em relação às da PD (Figura 16A). Em 21dpp, poucas células imunopositivas foram observadas na cartilagem hialina, além de marcação na MEC na região da fibrocartilagem (Figura 16B). Por outro lado, no grupo das fêmeas múltiparas, no 3dpp e no 21dpp, foram encontradas poucas células com marcação citoplasmática para colágeno do tipo II da êntese (Figura 16C-D).

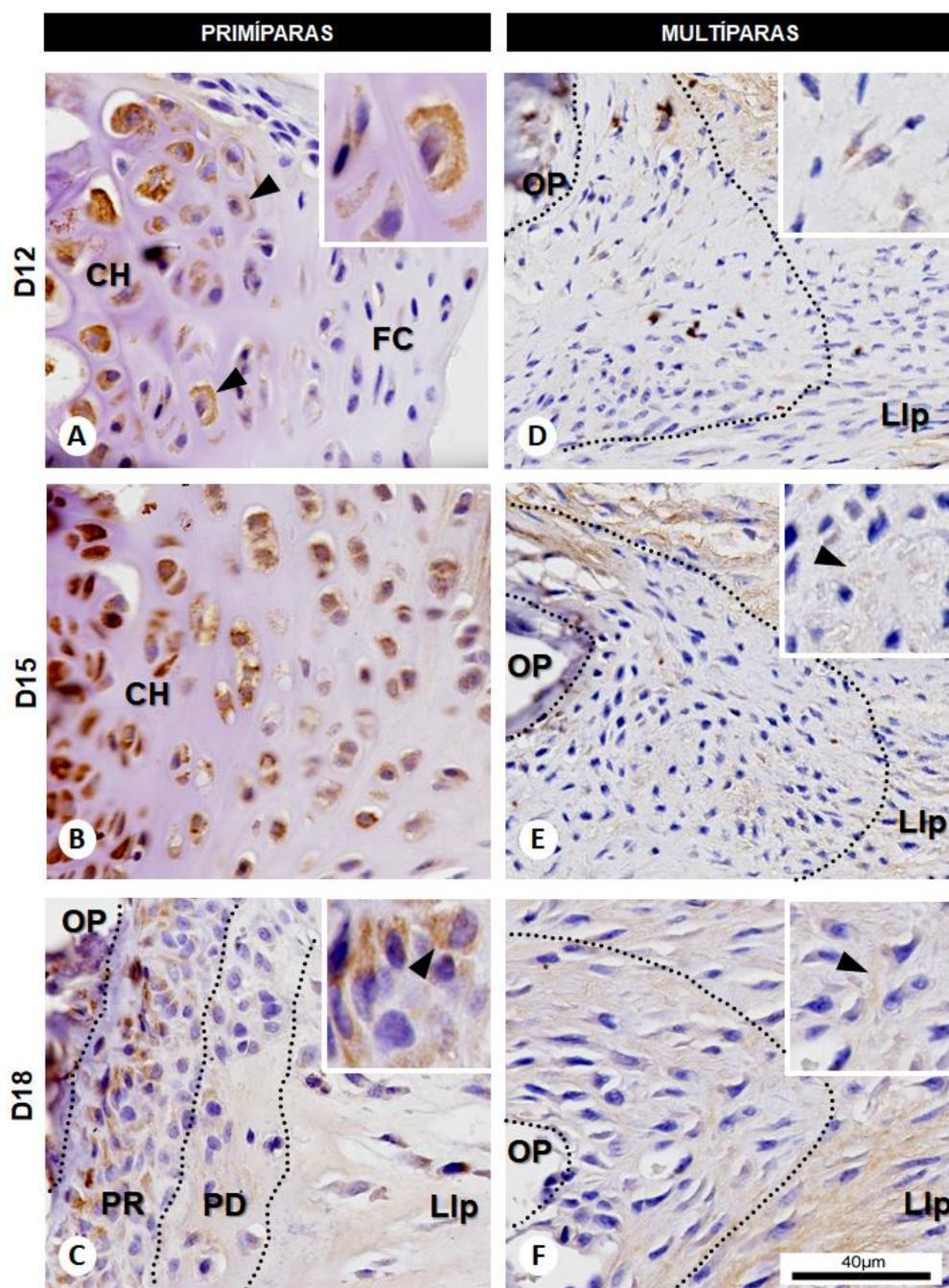


Figura 15. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço-temporal de colágeno do tipo II na articulação interpúbica em camundongos fêmeas primíparas (A, B e C) e múltiparas senescentes (D, E e F) durante a prenhez. Em A, note a marcação nos condrócitos hipertróficos

na cartilagem hialina (cabeça da seta e detalhe). Em **B**, além da marcação dos condrócitos na cartilagem hialina, percebe a marcação também nos fibrocondrócitos. Em **C**, note a marcação predominante nas células da êntese na porção proximal dos ossos púbicos (PR) e discreta marcação na matriz na porção distal (PD). Em **D**, percebe a discreta marcação citoplasmática das células (detalhe) na região da êntese. Em **E** e **F**, observe nos detalhes, a marcação na MEC (cabeça das setas) da êntese. Áreas demarcadas entre linhas pontilhadas (entre OP e LIP) correspondem à região aproximada da êntese. Imuno-histoquímica com revelação por DAB e coloração de Hematoxilina de Harrys. Barra = 40µm.

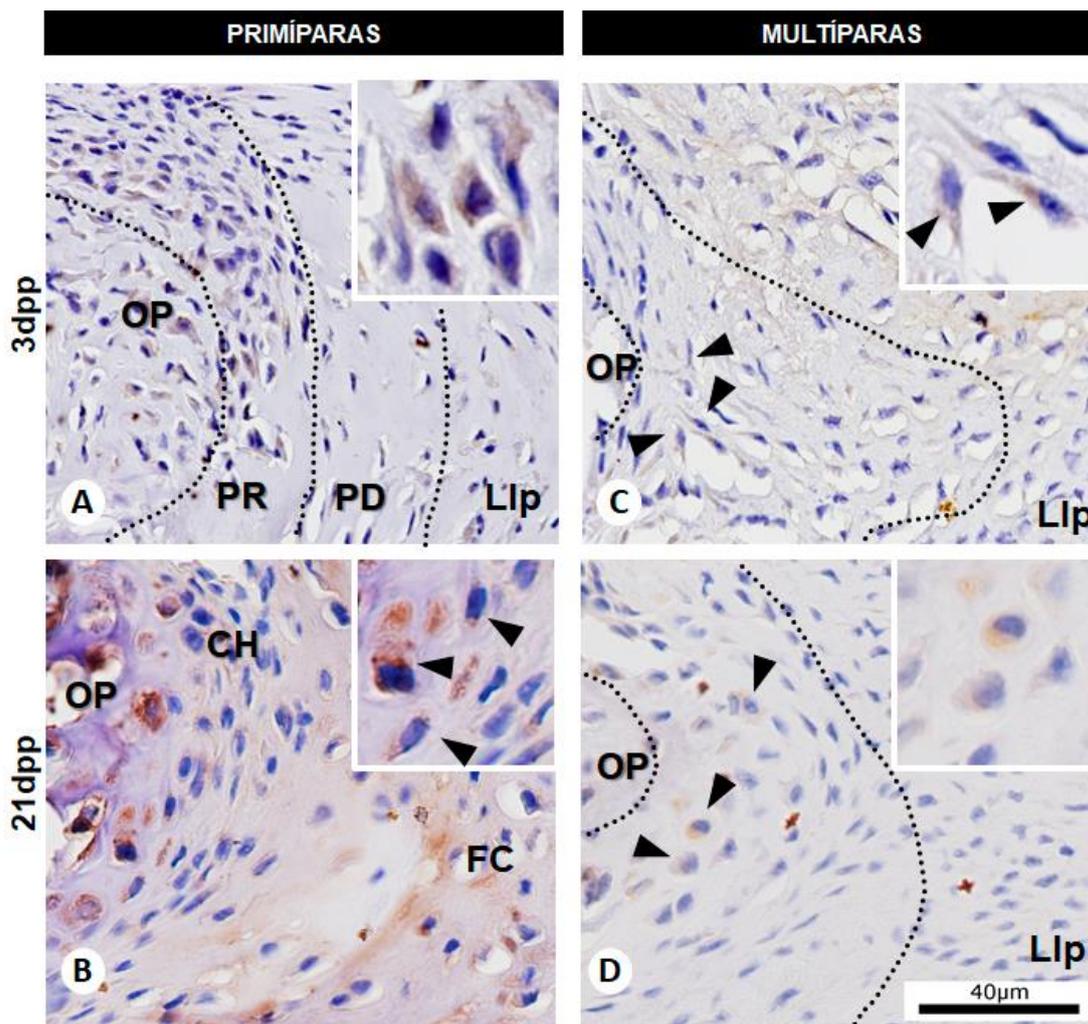


Figura 16. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de colágeno do tipo II na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas (**A** e **B**) e múltiparas senescentes (**C** e **D**) durante o pós-parto. Em **A**, note a predominância da marcação citoplasmática nas células da região proximal dos ossos púbicos (PR) (detalhe). Em **B**, percebe a marcação citoplasmática nos condrócitos hipertróficos (cabeça da seta), além da marcação matricial. Em **D** e **E**, observe a marcação citoplasmáticas de poucas células (cabeça da seta) na região da êntese. Áreas demarcadas entre linhas pontilhadas (entre OP e LIP) correspondem à região aproximada da êntese. Imuno-histoquímica com revelação por DAB e coloração de Hematoxilina de Harrys. Barra = 40µm.

A expressão gênica de doublecortin (*DCX*) (Figura 17) na articulação interpúbica em fêmeas primíparas mostra diferenças significativas no D18 e no 21dpp quando comparadas ao D12. Entretanto, é possível notar o padrão da expressão na articulação interpúbica, onde com o avançar da prenhez, no D18, ocorre uma redução significativa quando comparada ao grupo controle. No 3dpp evidencia-se um aumento significativo quando comparado ao D18. No 21dpp, há aumento significativo na expressão gênica de doublecortin, tanto comparado ao grupo controle ou ao grupo anterior (vs. 3dpp), mostrando que em 21dpp houve o maior nível de expressão entre os grupos analisados.

Nas fêmeas múltiparas, o perfil da expressão de doublecortin, embora não significativo, se assemelha ao encontrado nas fêmeas primíparas, com aparente redução no perfil da expressão gênica ao longo da prenhez e aumento em 21dpp. Contudo, apesar do maior nível de expressão em fêmeas múltiparas também ser em 21dpp, nas fêmeas múltiparas em 21dpp a expressão se assemelha ao encontrado em D12, porém, sendo significativamente menor quando comparado ao 21dpp de animais primíparas.

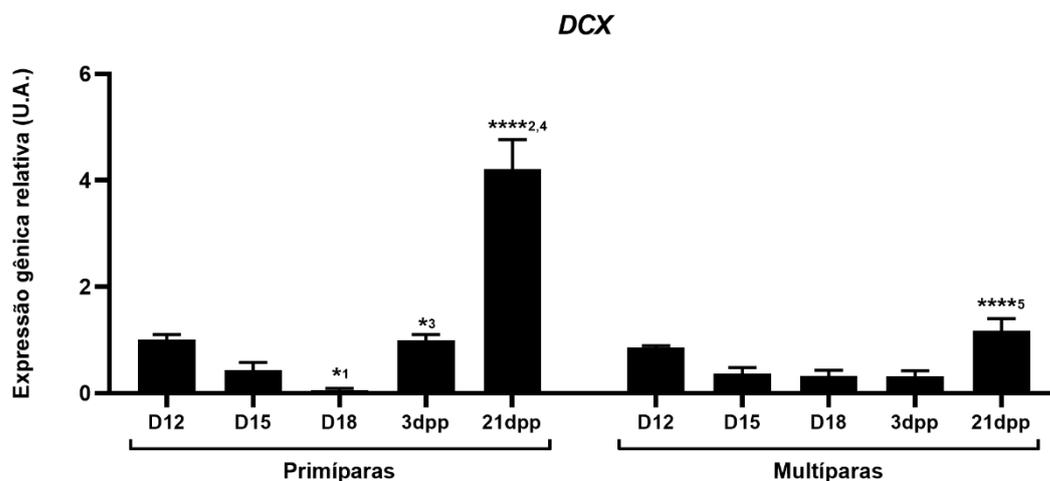


Figura 17. Representação gráfica da expressão gênica de doublecortin na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltiparas senescentes durante a prenhez e o pós-parto. As análises entre os grupos foram obtidas por *Two way ANOVA*, seguido pelo teste de Bonferroni. Significância, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Primíparas = ¹D18 vs. D12; ²21dpp vs. D12; ³3dpp vs. D18; ⁴21dpp vs. 3dpp; Múltiparas vs. Primíparas = ⁵21dpp M vs. 21dpp P. PCR em tempo real. U.A. = Unidade arbitrária. N = 3.

A análise da imunolocalização através da técnica IHQ de Doublecortin especificamente na êntese, por sua vez, tanto no D12 quanto no D15 é observada no citoplasma dos condrócitos hipertróficos, das células da cartilagem hialina e dos fibrocondrócitos (Figuras 18A e B). Já em múltíparas, os grupos no D12 e no D15 apresentam marcação celular e de MEC na região da êntese (Figuras 18D e E). Ao final da prenhez, no D18, o citoplasma das células e a MEC das regiões PR e PD das fêmeas primíparas apresentam imunomarcação (Figura 18C). Nas fêmeas múltíparas, a marcação na MEC da êntese é intensa quando comparada aos grupos D12 e D15 dos animais múltíparos (Figura 18F).

No pós-parto das primíparas e das múltíparas, a marcação demonstra ser menor, quando comparadas ao final da prenhez, no D18. Nas fêmeas primíparas, no 3dpp, a PR e a PD apresentam marcação acentuada no citoplasma das células e discreta marcação na MEC (Figura 19A). E no 21dpp, ainda há marcação citoplasmática em condrócitos hipertróficos, em condrócitos de cartilagem hialina e em fibrocondrócitos da articulação interpúbica, com discreta marcação na MEC (Figura 19B). Em contrapartida, nas fêmeas múltíparas, no 3dpp e no 21dpp, há uma grande redução da imunomarcação na MEC e nas células da êntese (Figura 19C e D).

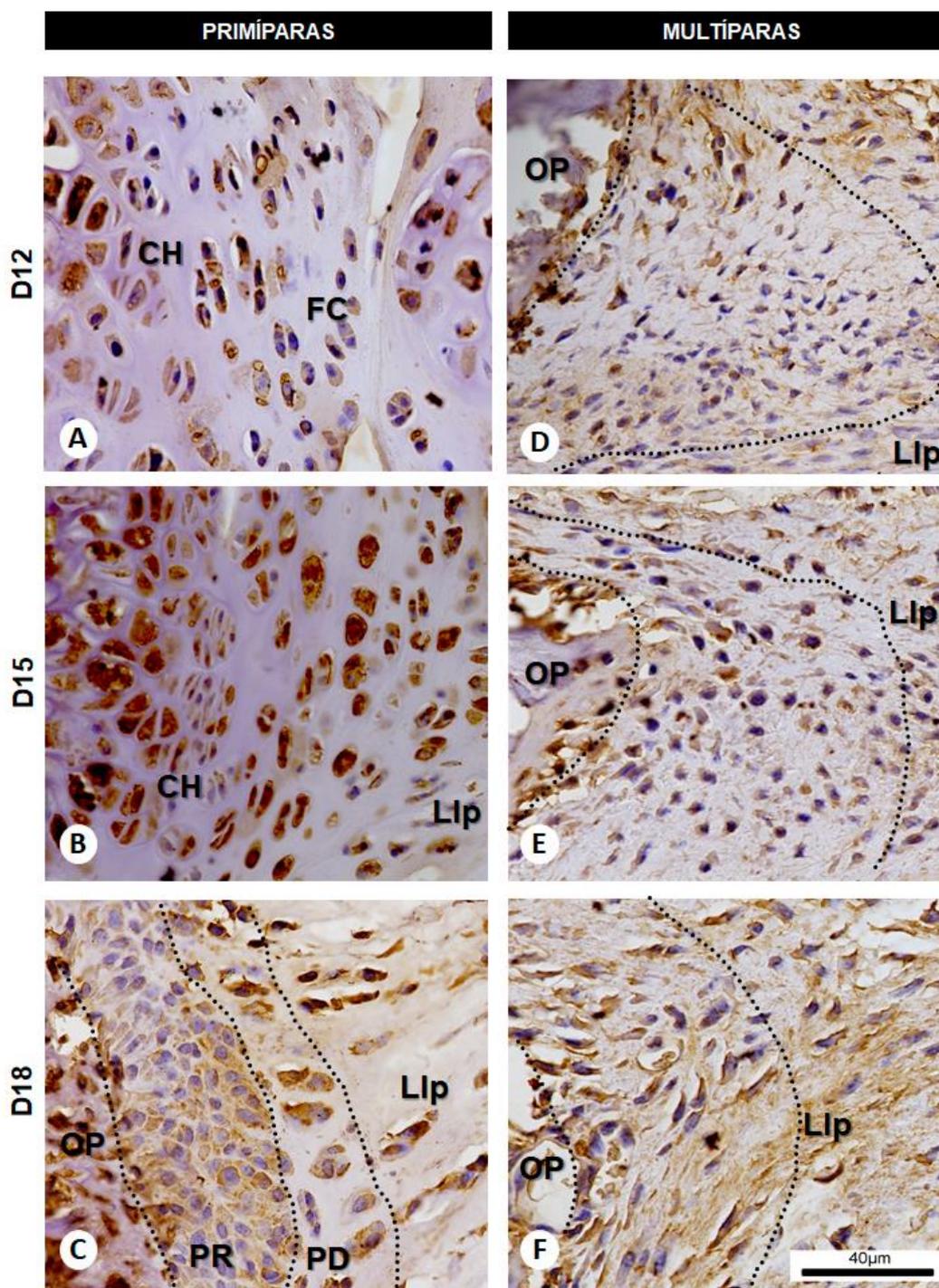


Figura 18. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de Doublecortin na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas (A, B e C) e múltiparas senescentes (D, E e F) durante a prenhez. Em A e B, note a marcação nos condrócitos hipertróficos na cartilagem hialina e na fibrocartilagem. Em C, perceba, na êntese, a marcação citoplasmática e matricial das células na região proximal (PR) e distal (PD) dos ossos púbicos. Em D-F observe a marcação matricial na região da êntese em continuidade ao ligamento interpúbico (Llp). Áreas demarcadas entre linhas pontilhadas (entre OP e Llp) correspondem à região aproximada da êntese. Imuno-histoquímica com revelação por DAB e coloração de Hematoxilina de Harrys. Barra = 40µm.

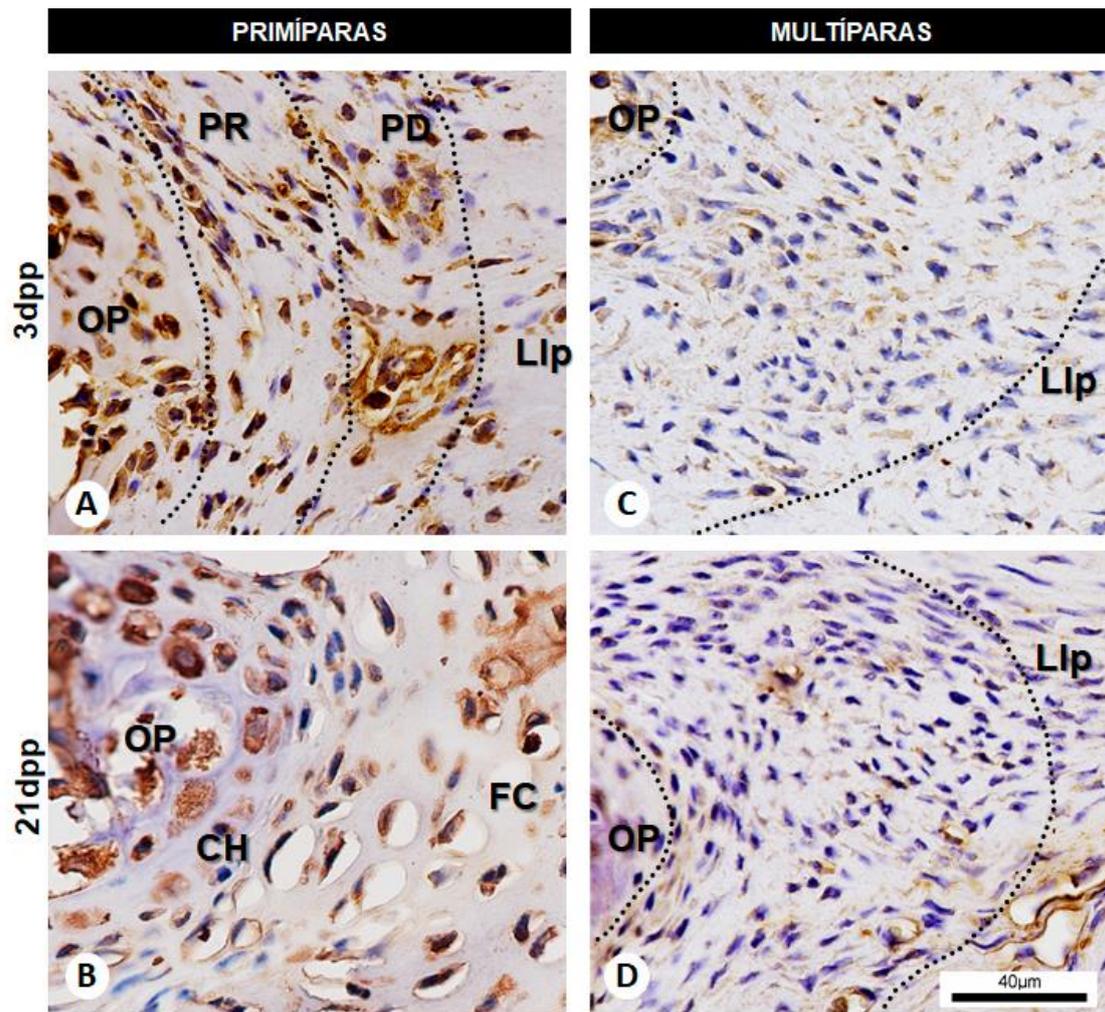


Figura 19. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de Doublecortin na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas (**A** e **B**) e múltiparas senescentes (**C** e **D**) durante o pós-parto. Em **A** e **B**, note a marcação citoplasmática das células do Llp, da êntese e do osso púbico. Em **C** e **D**, compare a redução qualitativa da marcação matricial na região da êntese em continuidade ao ligamento interpúbico (Llp). Áreas demarcadas entre linhas pontilhadas (entre OP e LIP) correspondem à região aproximada da êntese. Imuno-histoquímica com revelação por DAB e coloração de Hematoxilina de Harrys. Barra = 40µm.

A expressão gênica relativa de Sox-9 (Figura 20) na articulação interpúbica, em fêmeas primíparas, mostra aumento significativo ao final da prenhez, no D18, e no início do pós-parto, no 3dpp, o qual apresentou o maior nível de expressão, quando comparado ao D12. Já no 21dpp, a expressão gênica retorna ao nível semelhante daquele encontrado no D12, mas com redução significativa quando comparado ao 3dpp.

No grupo dos animais múltiparos, a expressão de Sox-9 não se altera significativamente durante a prenhez. No entanto, no pós-parto, assim como nas fêmeas primíparas, há um aumento significativo no 3dpp quando comparado ao D12 e ao D18. Já no 21dpp, há redução significativa na expressão gênica relativa comparada ao 3dpp, levando aos níveis similares do D12. Comparações dos mesmos dias de prenhez e pós-parto entre o grupo de animais múltiparos e primíparas, mostra redução significativa de Sox-9 em D18 nos animais múltiparos.

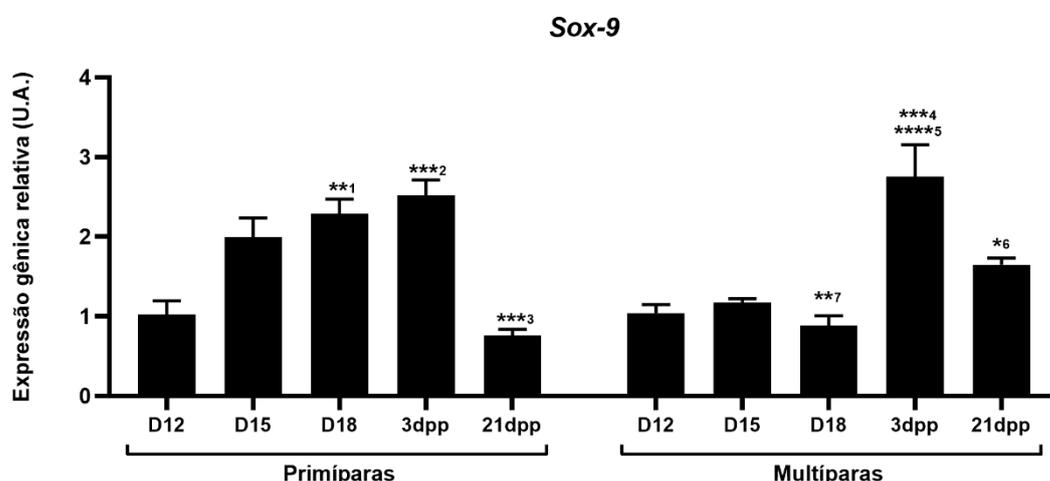


Figura 20. Representação gráfica da expressão gênica de Sox-9 na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltiparas senescentes durante a prenhez e o pós-parto. As análises entre os grupos foram obtidas por *Two way ANOVA*, seguido pelo teste de Bonferroni. Significância, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Primíparas = ¹D18 vs. D12; ²3dpp vs. D12; ³21dpp vs. 3dpp; Múltiparas = ⁴3dpp vs. D12; ⁵3dpp vs. D18; ⁶21dpp vs. 3dpp; Múltiparas vs. Primíparas = ⁷D18 M vs. D18 P. PCR em tempo real. U.A. = Unidade arbitrária. N = 3.

A análise da imunolocalização através da técnica de IHQ de SOX-9 especificamente na êntese da articulação interpúbica de fêmeas primíparas, no D12 e no D15, mostra-se específica no citoplasma dos condrócitos hipertróficos e dos fibrocondrócitos, com marcação nuclear. Além disso, a proporção de células positivas para SOX-9 no tecido cartilaginoso da articulação interpúbica de primíparas apresenta aparente aumento no D15 em relação ao D12 (Figuras 21A e B). Já em múltiparas, no D12 e no D15, não são observadas células imunomarcadas na região da êntese. Em

primíparas no D18, células positivas para SOX-9 estão presentes tanto na PR quanto na PD, com imunomarcção majoritariamente na porção citoplasmática (Figura 121C), tal marção não é evidente no grupo de animais múltiparas do mesmo dia de prenhez. (Figura 21F).

No pós-parto, no 3dpp de ambos os grupos primíparos e múltiparos, raras células apresentam marção discreta para SOX9 no citoplasma na PR e na PD da êntese (Figuras 22A e 22C). Em contrapartida, fêmeas primíparas no 21dpp apresentam marção de SOX9 em condrócitos hipertróficos e poucos condrócitos da cartilagem hialina na articulação interpública (Figura 22B). As fêmeas múltiparas no 21dpp, apesar de não apresentarem células positivas para SOX-9 na êntese, possuem células imunomarcadas para SOX-9 no Llp. (Figura 22D).

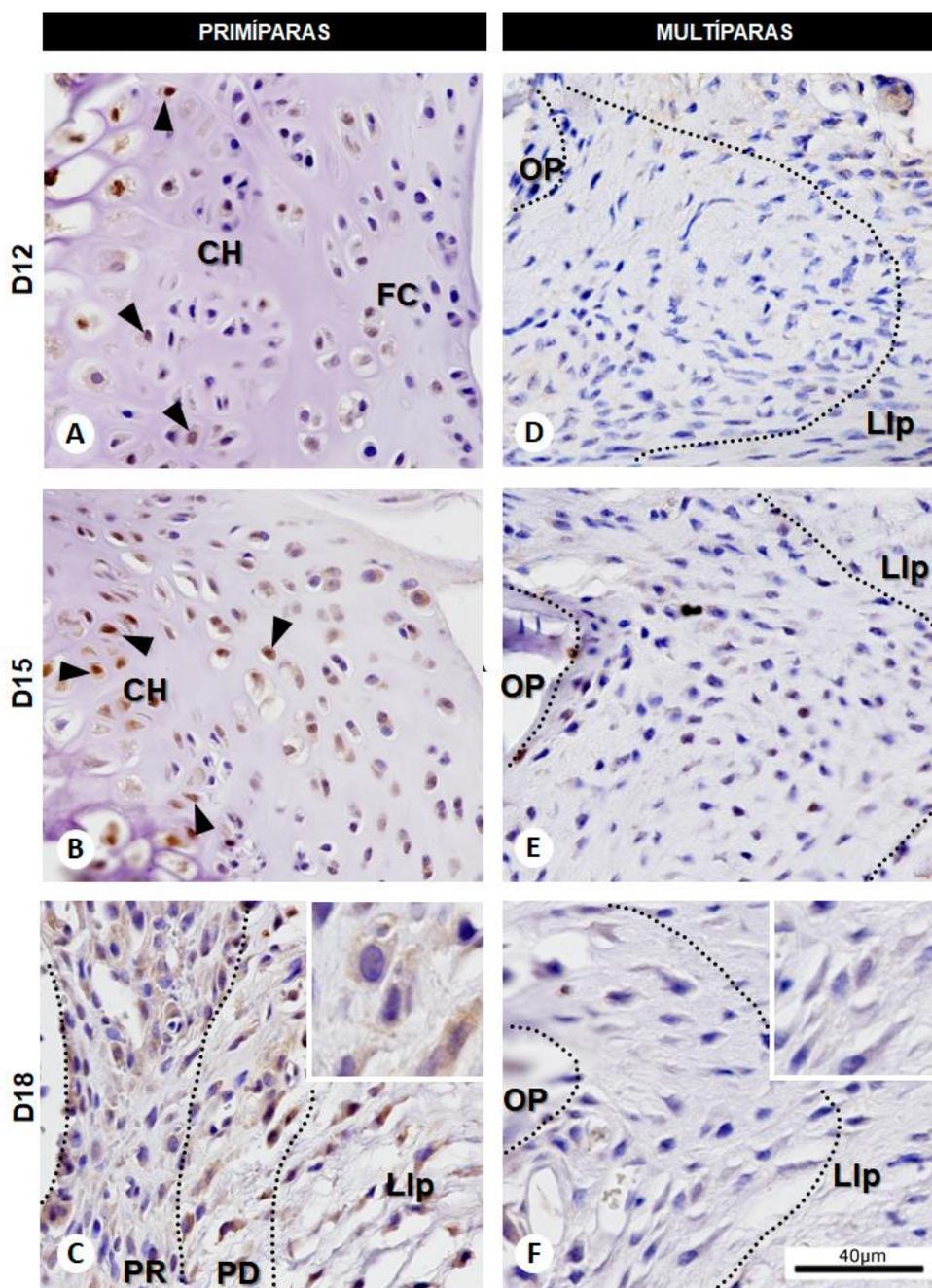


Figura 21. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de SOX-9 na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas (A, B e C) e múltiparas senescentes (D, E e F) durante a prenhez. Em A, note a marcação nos condrócitos hipertróficos na cartilagem hialina e alguns fibrocondrócitos, além de marcação nuclear (cabeça da seta). Em B, além da marcação dos condrócitos na cartilagem hialina, perceba a maior marcação nos fibrocondrócitos. Perceba também a marcação nuclear (cabeça da seta). Em C, note a marcação nas células (detalhe) da êntese na porção proximal dos ossos púbicos (PR) e na porção distal (PD). Em D e E, perceba a pouca marcação citoplasmática das células na região da êntese. Em F, observe no detalhe, a discreta marcação citoplasmática. Áreas demarcadas entre linhas pontilhadas (entre OP e LIP) correspondem à região aproximada da êntese. Imuno-histoquímica com revelação por DAB e coloração de Hematoxilina de Harrys. Barra = 40µm.

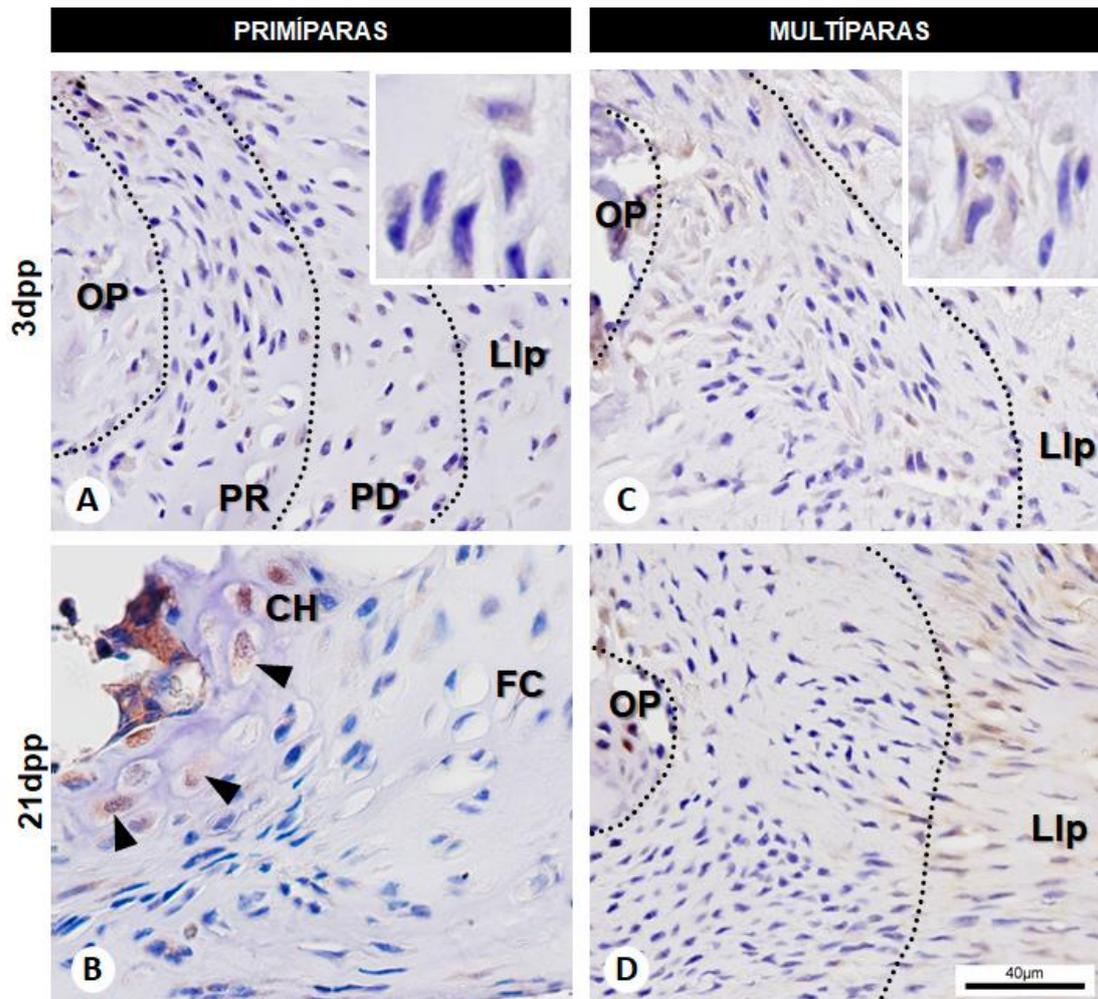


Figura 22. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de SOX-9 na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas (**A** e **B**) e múltiparas senescentes (**C** e **D**) durante o pós-parto. Em **A**, note, em detalhe, a discreta marcação citoplasmática nas células da região proximal e distal dos ossos púbicos. Em **B**, observe a marcação citoplasmática em poucas células na cartilagem hialina (cabeça da seta). Em **C**, perceba a discreta marcação citoplasmática das células na região da entese. Em **D**, note a ausência de marcação da região da êntese, em continuidade ao ligamento interpúbico (Lip). Áreas demarcadas entre linhas pontilhadas (entre OP e Lip) correspondem à região aproximada da êntese. Imuno-histoquímica com revelação por DAB e coloração de Hematoxilina de Harrys. Barra = 40µm.

A análise da expressão gênica relativa de *Runx-2* (Figura 23) na articulação interpúbica das fêmeas primíparas no D15 e no D18, apesar da aparente redução, não apresenta diferença estatisticamente significativa, quando em comparação ao D12. Enquanto, no 3dpp, há aumento significativo na expressão gênica, quando comparado ao D12 e ao D18, sendo os animais no 3dpp a apresentar maior expressão gênica de *Runx-2* entre os grupos analisados. Já no 21dpp, apesar da aparente redução na expressão gênica de *Runx-2*, não há diferença estatística significativa, quando comparado a 3dpp, porém, é significativamente maior quando em comparação ao D12.

Nas fêmeas múltiparas, apesar de não ser estaticamente significativo, no D15 e no D18 ocorre uma tendência à redução na expressão gênica e, na sequência, durante o pós-parto, aumento na expressão gênica de *Runx-2*, semelhante ao encontrado em animais primíparas. No entanto, comparações dos mesmos dias de prenhez e de pós-parto entre o grupo de animais múltiparas e de primíparas, mostra redução significativa de *Runx-2* em 3dpp e 21dpp nas fêmeas múltiparas.

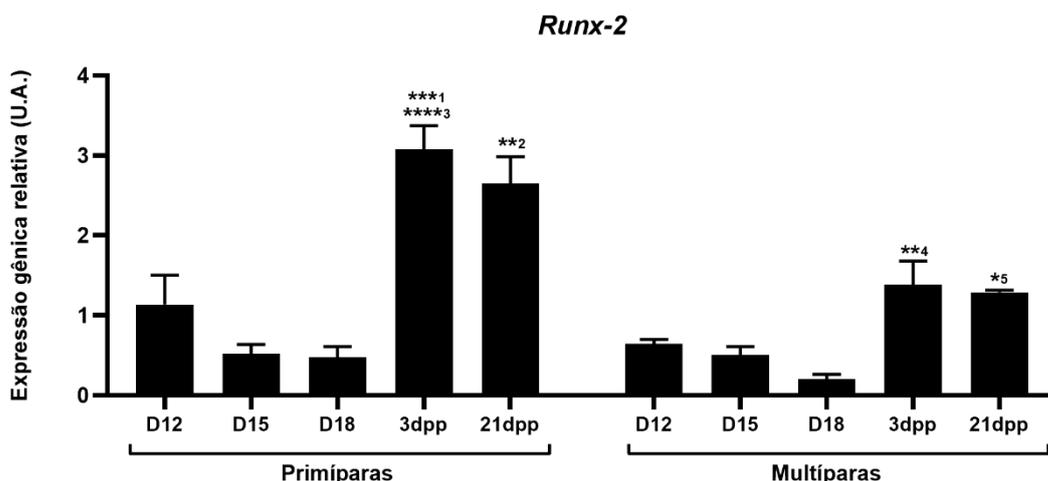


Figura 23. Representação gráfica da expressão gênica de *Runx-2* na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltiparas senescentes durante a prenhez e o pós-parto. As análises entre os grupos foram obtidas por *Two way ANOVA*, seguido pelo teste de Bonferroni. Significância, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Primíparas = ¹3dpp vs. D12; ²21dpp vs. D12; ³3dpp vs. D18dpp; Múltiparas vs. Primíparas = ⁴3dpp M vs. 3dpp P; ⁵21dpp M vs. 21dpp P. PCR em tempo real. U.A. = Unidade arbitrária. N = 3.

A análise da imunolocalização através da técnica de IHQ de RUNX-2 especificamente na êntese da articulação interpúbica, assim como a de SOX-9 do D12 ao D15 nas fêmeas primíparas, mostra-se específica no citoplasma dos condrócitos e dos fibrocondrócitos (Figuras 24A e B). Em fêmeas múltíparas, os grupos no D12 e no D15 apresentam qualitativamente a maior intensidade de imunomarcção nas células (Figura 24D e E).

Ao final da prenhez, no D18, em fêmeas primíparas, as células da PR e da PD apresentam marcação em seu citoplasma, sendo qualitativamente a maior expressão de RUNX-2 durante a prenhez (Figura 24C). Por outro lado, nas fêmeas múltíparas, no D18, a imunomarcção reduz-se no citoplasma das células da êntese, quando comparada ao D12 e ao D15 (Figura 24F).

No pós-parto de fêmeas primíparas, no 3dpp, nota-se qualitativamente a redução na marcação das células na PR e na PD (Figura 25A), quando comparada à marcação no final da prenhez, no D18. Ainda nas primíparas, no 21dpp, há a redução qualitativa da imunomarcção em alguns condrócitos presentes na cartilagem hialina da articulação interpúbica restabelecida (Figura 25B). Em fêmeas múltíparas, no 3dpp e no 21dpp, ocorre discreta marcação nas células (Figura 25C e D). Assim como a imunomarcção de SOX-9 no 21dpp, apesar da discreta marcação das células positivas para RUNX-2 na êntese, possuem células imunomarcadas no Llp.

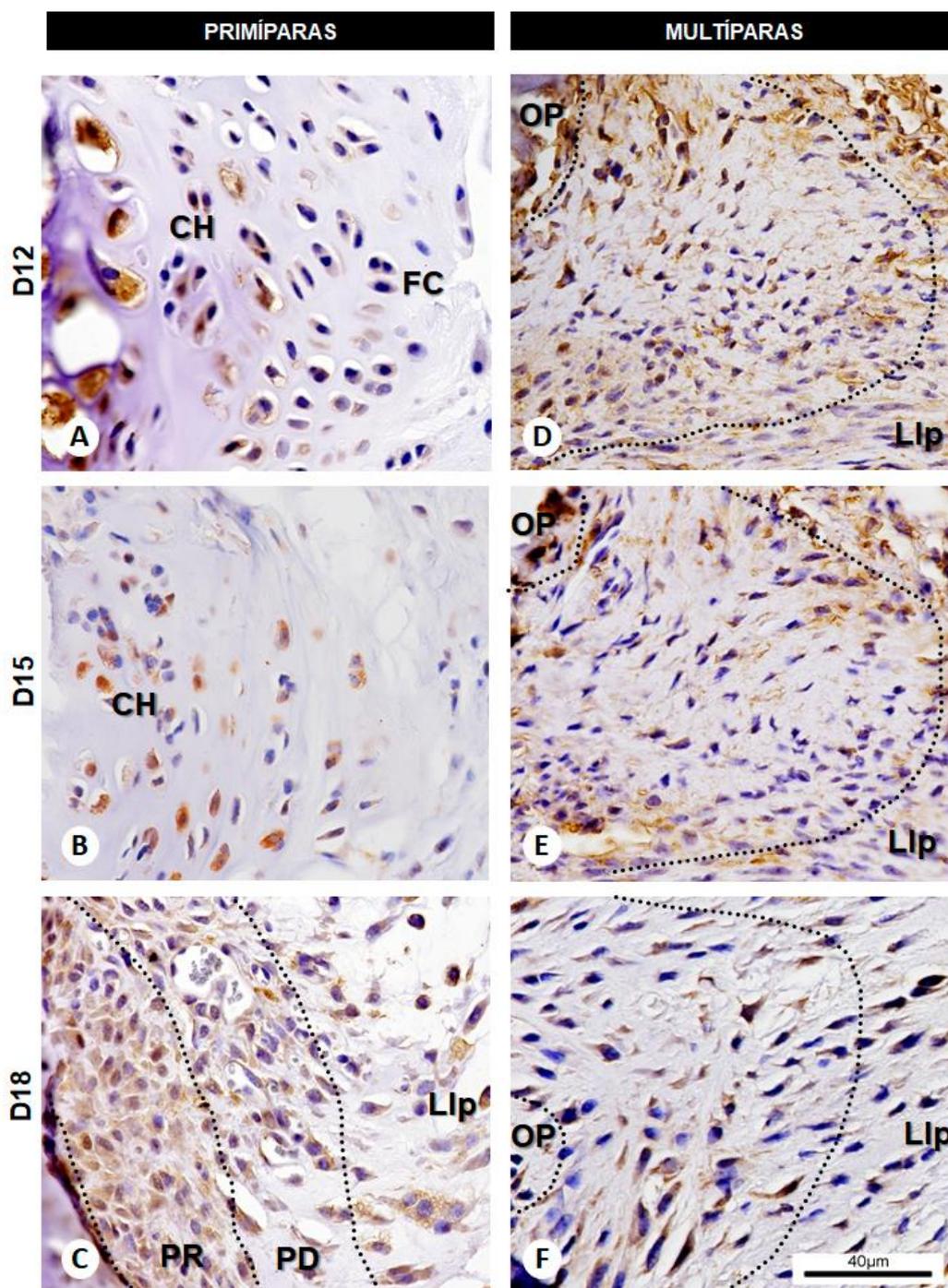


Figura 24. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de RUNX-2 na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas (A, B e C) e múltiparas senescentes (D, E e F) durante a prenhez. Em A e B, note a marcação nos condrócitos hipertróficos da cartilagem hialina e nos fibrocondrócitos. Em C, note a marcação nas células da êntese na porção proximal dos ossos púbicos (PR) e na porção distal (PD). Em D e E, perceba a redução da marcação na região da êntese. Em F, observe a marcação citoplasmática. Áreas demarcadas entre linhas pontilhadas (entre OP e LIP) correspondem à região aproximada da êntese. Imuno-histoquímica com revelação por DAB e coloração de Hematoxilina de Harrys. Barra = 40µm.

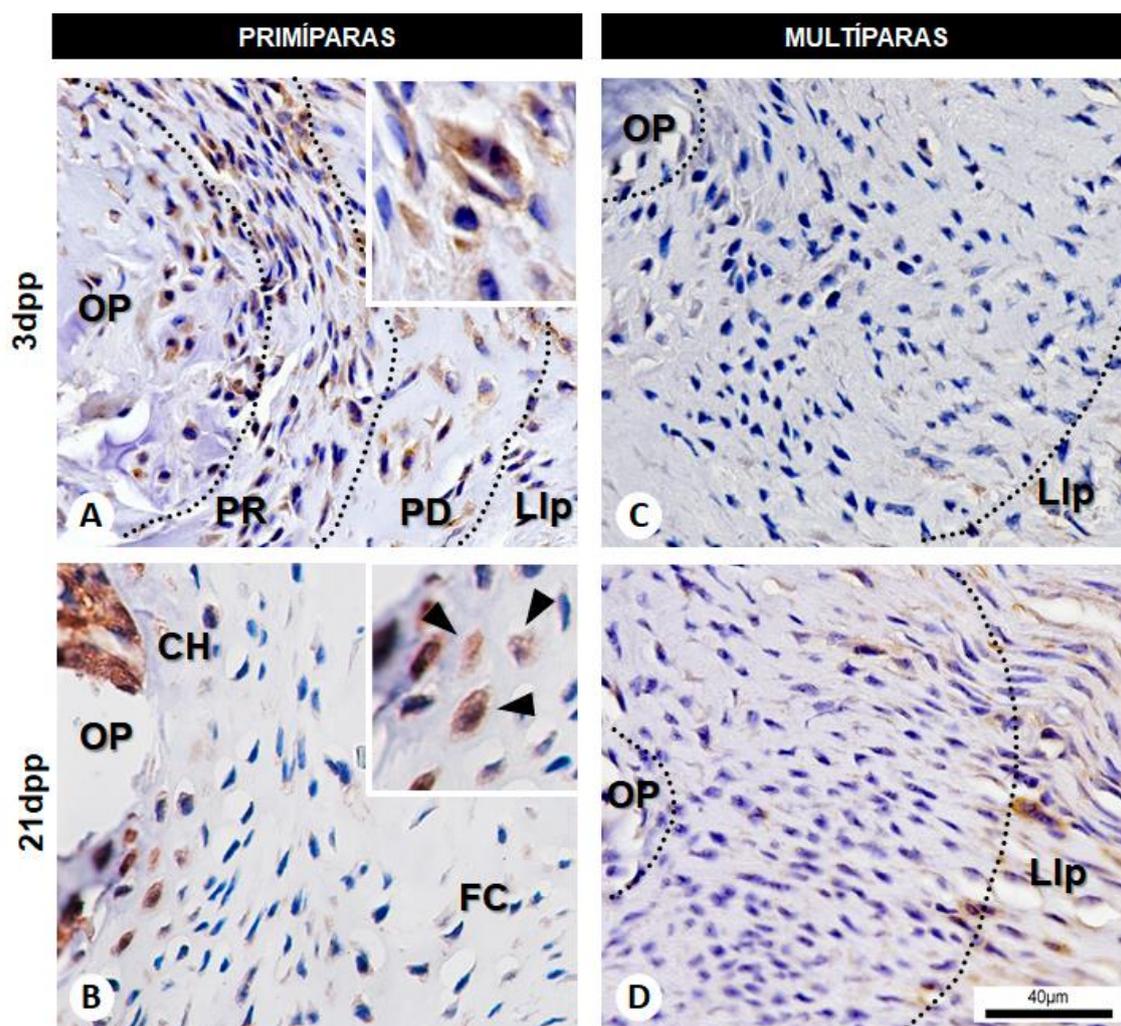


Figura 25. Fotomicrografias representativas da imunolocalização espaço temporal de RUNX-2 na êntese da sínfise púbica em camundongos fêmeas primíparas (A e B) e múltiparas senescentes (C e D) durante o pós-parto. Em A, note a marcação nas células (detalhe) da êntese na porção proximal dos ossos púbicos (PR) e na porção distal (PD). Em B, perceba a marcação de poucas células na região da êntese (cabeça da seta, detalhe). Em C e D, compare a discreta marcação da região da êntese em direção ao ligamento interpúbico (LIP). Áreas demarcadas entre linhas pontilhadas (entre OP e LIP) correspondem à região aproximada da êntese. Imuno-histoquímica com revelação por DAB e coloração de Hematoxilina de Harrys. Barra = 40µm.

A análise da expressão gênica relativa de colágeno 10 (*Col10a1*) (Figura 26) na articulação interpúbica, em fêmeas primíparas, mostra-se significativamente alteradas ao longo do processo de remodelação tecidual. No D15, houve aumento significativo na expressão gênica, no qual mostrou ser seu maior nível de expressão entre os grupos analisados. Enquanto no final da prenhez, no D18, houve redução significativa tanto em comparação ao D12 quanto ao D15. No pós-parto, em 3dpp e 21dpp, a expressão gênica de colágeno 10 é significativamente menor quando em comparação a D12.

As fêmeas múltiparas, por outro lado, apresentam perfil distinto dos encontrados em primíparas. Embora não tenha apresentado diferenças significativas em relação às suas alterações dos níveis de expressão gênica, apresenta aparente redução de expressão de *Col10a1* ao longo da prenhez e aumento no pós-parto. Comparações dos mesmos dias de prenhez e de pós-parto entre o grupo de animais múltiparos e de primíparas, mostra redução significativa da expressão de *Col10a1* no D12 e no D15 de fêmeas múltiparas.

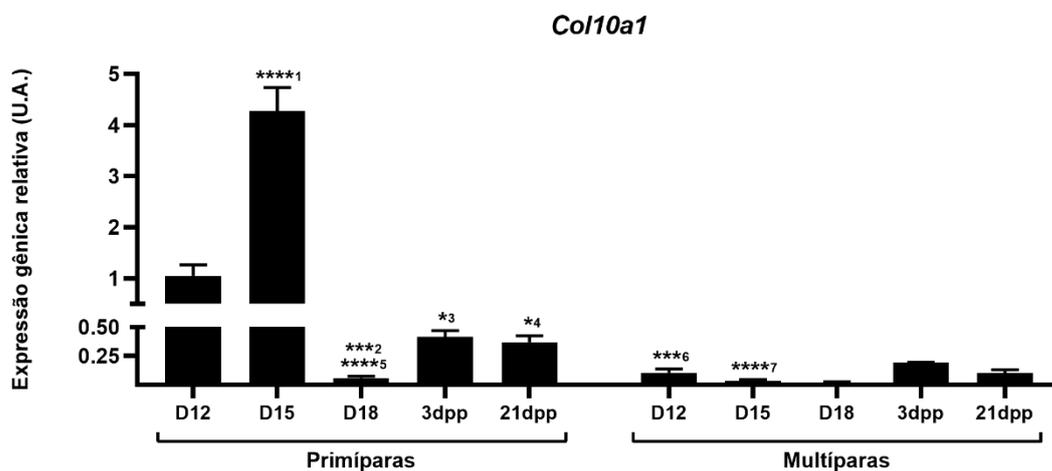


Figura 26. Representação gráfica da expressão gênica de Colágeno 10 (*Col10a1*) na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltiparas senescentes durante a prenhez e pós-parto. As análises entre os grupos foram obtidas por *Two way ANOVA*, seguido pelo teste de Bonferroni. Significância, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Primíparas = ¹D15 vs. D12; ²D18 vs. D12; ³3dpp vs. D12; ⁴21dpp vs. D12; ⁵D18 vs. D15; Múltiparas vs. Primíparas = ⁶D12 M vs. D12 P; ⁷D15 M vs. D15 P. PCR em tempo real. U.A. = Unidade arbitrária. N = 3.

A análise da expressão gênica relativa de sonic hedgehog (*Shh*) (Figura 27) na articulação interpúbica das fêmeas primíparas não se mostra significativa, porém indica redução nos níveis de expressão gênica com o avançar da prenhez, no D15 e no D18, quando comparadas ao D12. No pós-parto, há aumento significativo na expressão gênica no 3dpp, tanto em comparação ao D12, quanto em comparação ao final da prenhez, no D18. Mostrando que no 3dpp ocorre o maior nível de expressão entre os grupos analisados. Em 21dpp, houve uma redução significativa quando em comparação ao 3dpp, porém não se mostra diferente significativamente ao encontrado no D12.

Nos animais múltiparos, durante a prenhez, estatisticamente não há variação da expressão gênica de *Shh*. Comparações dos mesmos dias de prenhez e de pós-parto entre o grupo de animais múltiparos e primíparas, mostra redução significativa da expressão gênica de *Shh* no 3dpp de fêmeas múltiparas.

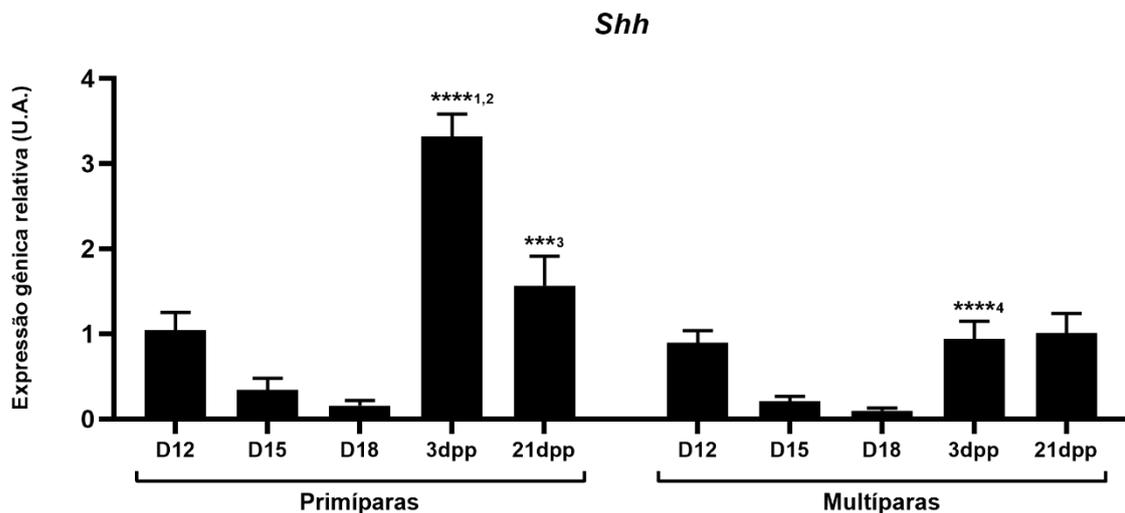


Figura 27. Representação gráfica da expressão gênica de sonic hedgehog na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltiparas senescentes durante a prenhez e o pós-parto. As análises entre os grupos foram obtidas por *Two way ANOVA*, seguido pelo teste de Bonferroni. Significância, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Primíparas = ¹3dpp vs. D12; ²3dpp vs. D18; ³21dpp vs. 3dpp; Múltiparas vs. Primíparas = ⁴3dpp M vs. 3dpp P. PCR em tempo real. U.A. = Unidade arbitrária. N = 3.

A normalização do cálculo do $\Delta\Delta Ct$ para cada análise da expressão gênica por meio do PCR em tempo real nos permite a interpretação da dinâmica dos perfis de expressão gênica de *Col2a1*, *DCX*, *Sox-9*, *Runx-2*, *Col10a1* e *Shh* na articulação interpúbica de fêmeas primíparas e múltiparas senescentes, após o sexto parto (Figura 28).

Nos animais primíparas, durante o processo de formação do ligamento interpúbico, do D12 ao D15, há um aumento na expressão gênica de *Col2a1*, *Sox-9* e *Col10a1*. Por outro lado, há redução no perfil dos níveis de expressão de *Shh*, *Runx-2* e *DCX*. Durante o processo de relaxamento do ligamento interpúbico, do D15 ao D18, *Sox-9* ainda permanece aumentado, enquanto *Runx-2* estabiliza-se. Por outro lado, pode-se observar que *Col2a1*, *Shh*, *Col10a1* e *DCX* tem sua expressão reduzida. Durante a transição das fases de relaxamento para a de recuperação, no início do pós-parto, do D18 ao 3dpp, todos os genes apresentam elevação na expressão gênica. Durante o período do pós-parto, do 3dpp ao 21dpp, *Col2a1* e *DCX* apresentam aumento gradativo na expressão gênica, enquanto *Sox-9*, *Shh*, *Col10a1* e *Runx-2* mostram perfil de redução da expressão gênica.

No que diz respeito ao perfil da expressão gênica espaço-temporal encontrado nos animais múltiparas, *Sox-9* sofre um aumento gradativo do D12 ao D15. Por outro lado, há redução gradativa de *Col2a1*, *DCX*, *Runx-2*, *Col10a1* e *Shh* até o D15. Do D15 ao D18, o perfil de expressão de *Col2a1*, *DCX*, *Col10a1* e *Shh* mantém-se estável, enquanto *Sox-9* e *Runx-2* apresentam redução gradativa até o D18. Entretanto, do final da prenhez e ao início do pós-parto, isto é, do D18 ao 3dpp, a expressão gênica de *Col2a1*, *Sox-9*, *Runx-2* e *Shh* mostra-se elevada até o 3dpp, enquanto *Col10a1* e *DCX* tendem a apresentar um perfil similar ao encontrado no D18. Durante o pós-parto, do 3dpp ao 21dpp, *DCX* e *Shh* apresentam aumento gradativo da expressão gênica, enquanto, *Col2a1*, *Sox-9*, *Runx-2* e *Col10a1* apresentam perfil de redução.

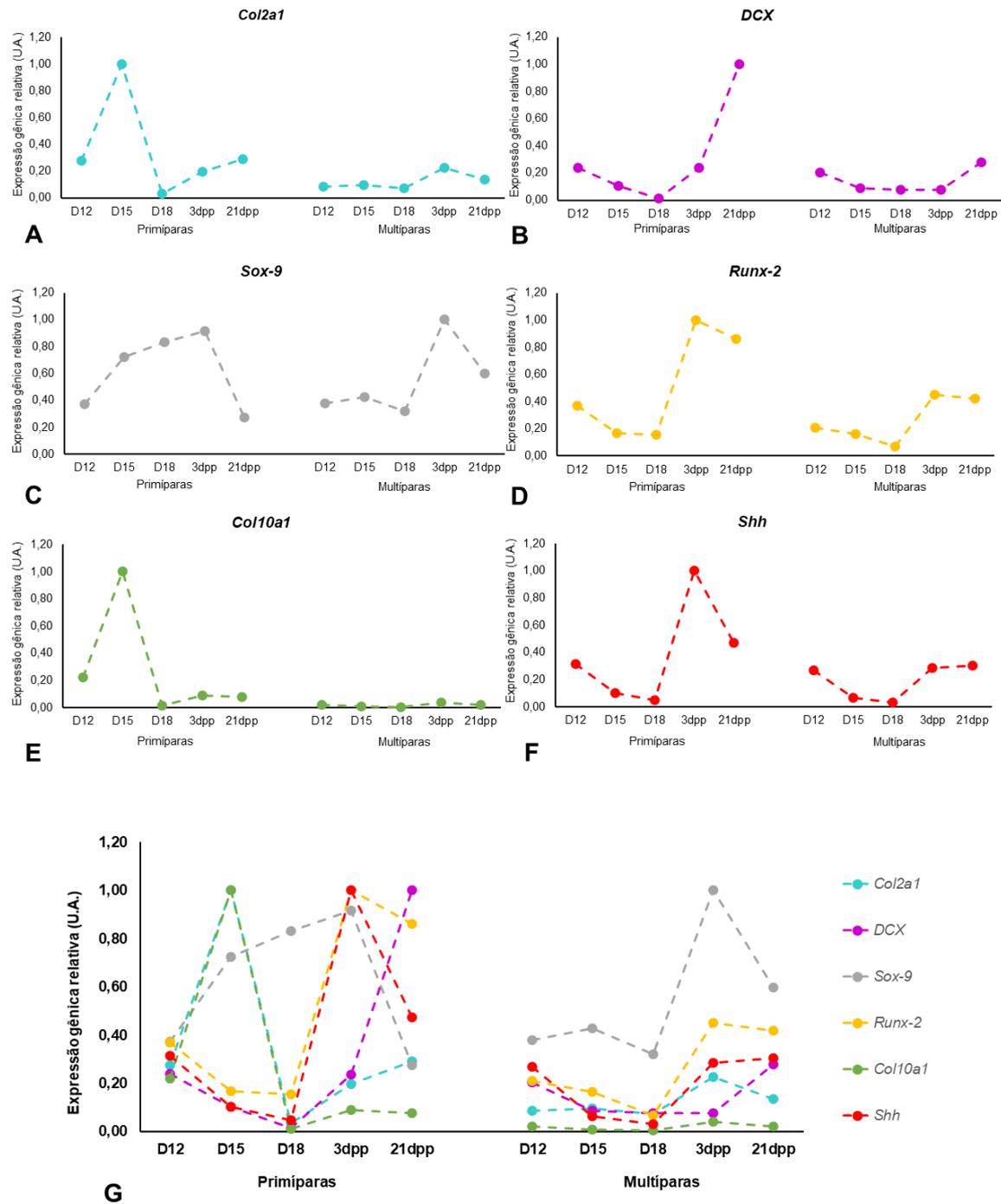


Figura 28. Diagramas da distribuição temporal da expressão gênica relativa de *Col2a1*, *DCX*, *Sox-9*, *Runx-2*, *Col10a1* e *Shh* (A-H), e suas sobreposições (I) obtidos por PCR em tempo real e normalizados em função dos valores máximos de expressão gênica na articulação interpúbica de camundongos primíparas e múltiparas senescentes.

5. DISCUSSÃO

Nosso trabalho investiga a remodelação tecidual da sínfise púbica dos camundongos fêmeas primíparas e múltiparas senescentes, na sexta prenhez, frente aos estímulos da prenhez e do parto. Especificamente, investigamos as modificações decorrentes da paridade e da idade no fenótipo da população celular e na MEC da êntese da articulação interpúbica, e na expressão gênica e imunolocalização de *Sox-9*, *Runx-2*, *Shh*, *DCX*, *Col2a1* e *Col10a*, fatores classicamente envolvidos na condrogênese e na osteogênese. Sabendo que tais processos são essenciais para assegurar o balanço homeostático na remodelação da sínfise púbica de camundongos, é nosso objetivo entender o papel da êntese e avaliar as modificações morfológicas e moleculares da sua população celular e da sua MEC frente ao estresse fisiológico e à deterioração das células em decorrência da idade e do número de partos.

Consonni e colaboradores (2012) relataram que, após o primeiro parto, camundongos fêmeas primíparas apresentam articulação interpúbica com morfologia similar àquela observada em fêmeas não prenhes, ao passo que fêmeas múltiparas senescentes apresentam comprometimento no restabelecimento desta articulação. A ausência da reorganização e da restauração dos componentes cartilagíneos da SP no pós-parto indicam que a multiparidade e a senescência em camundongos podem promover alterações significativas na resposta celular e na matriz extracelular da sínfise púbica no processo de retorno, após 40 dias do parto (Consonni *et al.*, 2012). Assim, neste trabalho, investigamos a articulação interpúbica das fêmeas múltiparas e senescentes durante a sexta prenhez (D12, D15 e D18) e o pós-parto (3dpp e 21dpp), em comparação à primeira prenhez de fêmeas nulíparas jovens.

Nossos resultados apoiam a idade e a paridade como fatores significativos que impactam a biologia da êntese da articulação interpúbica. De modo similar aos trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, as alterações morfológicas mediadas pelo processo fisiológico da prenhez, em animais primíparos, leva ao desenvolvimento de uma estrutura com gradações de MEC e de população celular distinta denominada êntese, a qual está presente do final da primeira prenhez até os primeiros dias pós-parto (Castelucci *et al.*, 2018). Por outro lado, na sexta prenhez de animais múltiparos senescentes, a êntese encontra-se presente no D12 e aparentemente não apresenta alterações morfológicas significativas em sua estrutura durante os outros dias de estudo na prenhez e o pós-parto. A avaliação de fatores condrogênicos e osteogênicos nas porções cartilaginosas na êntese da articulação interpúbica destacou a fina regulação espaço-temporal da expressão destes fatores determinantes das linhagens condrogênica e osteogênica para a fase do retorno da articulação interpúbica durante a remodelação tecidual no pós-parto.

A investigação morfológica, demonstrou semelhanças e diferenças quanto às estruturas cartilaginosas e, principalmente, à êntese da articulação interpúbica entre fêmeas

primíparas e múltiparas senescentes. Nos animais primíparas, foi possível distinguir morfologicamente as regiões da êntese: a porção proximal e a distal aos ossos púbicos, corroborando a formação e o estabelecimento de populações celulares distintas na êntese ao longo do processo de formação do Llp e a retração dos coxins de cartilagem hialina ao final da prenhez, de acordo com Castelucci e colaboradores (2018).

Castelucci e colaboradores (2018) demonstraram que, ao final da primeira prenhez, no D19, a êntese fibrocartilaginosa, que corresponde a zona de transição de fibrocartilagem na interface ao osso (Benjamin *et al.*, 2000), na articulação interpúbica, permitindo a modificação tecidual entre os ossos púbicos e o Llp. Esses autores evidenciaram ainda que, durante o pós-parto, no 1dpp, a êntese possui características de êntese fibrosa, caracterizada pela ancoragem das fibras de colágeno diretamente ao osso (Benjamin *et al.*, 2002), permitindo a interação direta entre a PR e o Llp. No 3dpp, ocorre a diferenciação em porções cartilaginosas na PD da êntese, que possivelmente contribuem para a reestruturação da cartilagem hialina da SP após 10dpp (Castelucci *et al.* 2018). Sendo assim, nossos dados de microscopia de luz e sob luz polarizada corroboram, de forma complementar, a esses dados da literatura, pois demonstram o processo de reaproximação dos ossos púbicos e de restabelecimento dos coxins de cartilagem contínuo até o 21dpp em animais primíparas.

Diferentemente do encontrado nas fêmeas primíparas, nas múltiparas, durante a sexta prenhez e o pós-parto, foi observada, em todos os dias desse estudo, a presença de estrutura semelhante à êntese fibrosa, na qual as fibras colágenas do Llp apresentaram-se diretamente contínuas ao osso púbico. As ênteses fibrosas estão sujeitas ao maior risco de ruptura, uma vez que a ausência da porção fibrocartilaginosa nesse tipo de êntese altera diretamente suas características biomecânica (Rodeo *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1997; Galatz *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006; Thomopoulos *et al.*, 2003). Estudos epidemiológicos sugerem que muitas mulheres não conseguem se recuperar da distensão acentuada do canal de parto causados pelos processos fisiológicos da gravidez, podendo desempenhar papel importante na causa do POP (Mant *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 2006). Dessa forma, nossos resultados indicam que a paridade e a idade são fatores alteram morfologicamente a estrutura da êntese na sínfise púbica e, possivelmente, sua biomecânica.

Assim como no processo de formação de êntese fibrocartilaginosa dos tendões de Aquiles, patelar e supraespinal de camundongos (Dyment *et al.*, 2015), nossos resultados ultraestruturais apontaram distintas populações celulares em diferenciação de condrócitos e de fibrocondrócitos durante a prenhez e o pós-parto na êntese de animais primíparas e de múltiparas senescentes. Em fêmeas primíparas, no D12, há presença de fibrocondrócitos típicos da SP. Do D15 ao 3dpp, com a formação da êntese, origina-se uma população de células na PR como àquelas semelhantes ao fenótipo de fibroblastos, conforme descrição de Castelucci e colaboradores (2018). A presença de células semelhantes a fibroblastos na PR

da êntese pode indicar uma população de células precursoras, que embora apresentem a mesma origem embrionária dos fibroblastos, podem se diferenciar segundo as propriedades biomecânicas, a sinalização molecular e hormonal, às quais são submetidas (Komuro 1990). Considerando esses achados na literatura, a presença de células semelhantes a fibroblastos também pode ser necessária ao restabelecimento das peças cartilaginosas e de sua população celular, como os fibrocondrócitos, semelhantes àqueles encontrados no 21dpp.

Em animais múltiparos senescentes, apesar de não ocorrer a evidente diferenciação em PR e PD, como observado em primíparos, as células da êntese demonstram núcleo de cromatina frouxa e organelas envolvidas na via biossintética-secretora, sugerindo fenótipo de células metabolicamente ativas e não quiescentes. Dado que no envelhecimento, as fibrilas de colágeno tornam-se mais compactas e orientadas (Carvalho e Vidal Bde, 1994), nossos resultados mostraram que as células da êntese se alinham paralelamente às fibras colágenas e apresentam características morfológicas de fibroblastos ativos até ao final da prenhez, no D18. Já no pós-parto, são encontradas também células de morfologia semelhante a fibrócitos, com núcleo de cromatina mais condensada e poucas organelas citoplasmáticas, caracterizando-se como células em estágio de quiescência, ou seja, com atividade metabólica reduzida levando a uma parada, possivelmente reversível, no ciclo celular (Cheung *et al.*, 2013).

A população celular das células presentes na cartilagem produz e mantém a integridade e composição de sua MEC, garantindo as propriedades biomecânicas dos tecidos cartilaginosos (Wight *et al.*, 1992). Assim, a síntese dos componentes da MEC da êntese relacionam-se diretamente à sua população celular: fibrocondrócitos e células semelhantes a fibroblastos (Blitz *et al.*, 2009; Eyal *et al.*, 2019; Schwartz *et al.*, 2015; Felsenthal *et al.*, 2018). A estrutura e a função da êntese estão intimamente ligadas ao estabelecimento e à remodelação da sua MEC, composta classicamente por proteoglicanos, como o agrecan e o versican (Ahamed e Nowlan 2020) (Rossetti *et al.*, 2017). Além disso, o principal componente fibrilar encontrado na MEC êntese, é o colágeno (Ahmed e Nowlan, 2020).

O colágeno é uma proteína estrutural presente na MEC, cuja sua estrutura é formada por uma tripla hélice de cadeias polipeptídicas (Ricard-Blum 2011). Esta tripla hélice é estabilizada pela presença de glicina, prolina e hidroxiprolina, além de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (Persikov *et al.*, 2005) com lisina e aspartato (Fallas *et al.*, 2009), resultando em ligações cruzadas (Bailey *et al.*, 1998). Essas ligações cruzadas têm como principal função estabilizar a estrutura das fibrilas colágenas, promovendo resistência aos tecidos compostos por colágeno (Bailey 2001).

Assim, as fibras de colágeno agem como o principal componente redutor de estresse biomecânico, essencial para a estabilidade mediante às forças exercidas nas ênteses (Killian, 2021), nossos resultados a respeito da disposição das fibras colágenas mostraram a

organização preferencial das fibras birrefringentes variando de perpendiculares à abertura interpúbica no D12 para paralelas até o 3dpp, retornando à organização perpendicular no 21dpp. Dado que a orientação das fibras de colágeno depende das forças incidentes no tecido conjuntivo (Yang *et al.*, 2019; Whelan *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 2019), nossos dados sugerem que com o restabelecimento da fibrocartilagem, o estímulo biomecânico de reaproximação dos ossos modifica a orientação das fibras colágenas, para maior resistência às forças de cisalhamento em animais primíparos.

Assim, tendo em vista que a multiparidade e a idade impactam o retorno no pós-parto de animais múltiparos fazendo com que o Llp permaneça (Consonni *et al.*, 2012), nossos resultados evidenciaram diferenças em relação à disposição das fibras colágenas em animais múltiparos senescentes durante a sexta prenhez e o pós-parto. Em todos os dias de estudo, as fibras colágenas apresentaram disposição paralela à abertura da articulação. Esses resultados são similares ao descrito por Consonni e colaboradores (2012) no Llp de animais múltiparos 40dpp. Deste modo, nossas análises sugerem que, em animais múltiparos senescentes, possivelmente devido à permanência do Llp, a êntese encontra-se sujeita à constante força de estiramento durante e após prenhez, e não de cisalhamento. Essa hipótese é suportada, pois à medida que as forças são transduzidas em resposta celular nos fibroblastos, estas células apresentam alteração de fenótipo e se alinham paralelamente ao eixo pré-tensionado (Haston *et al.*, 1983).

De acordo com o balanço dos componentes da MEC, como colágeno, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fibras elásticas e água, o tecido conjuntivo é capaz de resistir a altas tensões de tração ou de compressão (Parry e Craig, 1988). Deste modo, a organização das fibras colágenas influencia diretamente nas propriedades biomecânicas do tecido (Handsfield *et al.*, 2016). Tendo em vista a organização helicoidal das fibras colágenas em *crimps*, como um fator importante para a proteção contrarruptura durante a ação das forças de tração (Willians *et al.*, 1985), nossos resultados indicam que a presença de *crimps* na êntese de animais primíparos e de múltiparos senescentes se faz necessária para resistência às altas tensões durante a prenhez e o pós-parto. Ademais, sendo o arranjo de fibras colágenas em *crimps* uma adaptação dinâmica do tecido às forças a que está submetido, mantendo a integridade e força da articulação interpúbica (Pinheiro *et al.*, 2014), nossas análises, particularmente àquelas observando as características ultraestruturais, indicam que as células da êntese estão metabolicamente ativas e respondem aos estímulos da prenhez e do pós-parto.

Além de *crimps*, o diâmetro das fibrilas de colágeno reflete as propriedades biomecânicas de tecidos submetidos às forças de tração (Gathercole e Keller, 1991; Stegenga *et al.*, 1991; Vidal, 1995; Patterson-Kane *et al.*, 1997; Berkovitz, 2000; Ottani *et al.*, 2001). Consonni e colaboradores (2012) relataram que as forças de tensão, à medida em que a

primeira prenhez progride, resultam no aumento do diâmetro das fibrilas de colágeno da SP para remodelar o canal de parto. Estes autores ainda mostraram que, no 40dpp, o diâmetro das fibrilas de colágeno em camundongos primíparos reduz, em razão da reaproximação dos ossos púbicos, como resultado do restabelecimento da fibrocartilagem (Consonni *et al.*, 2012).

O aumento na espessura da fibra colágena, sob microscopia de luz polarizada, mostra-se por alteração da coloração, sendo progressivamente de verde para amarelo, laranja e vermelho (Hiss *et al.*, 1998; Junqueira *et al.*, 1982). Assim, nossas análises, em conjunto com os dados de morfometria, revelaram tanto em animais primíparos quanto em múltiparos senescentes o aumento gradativo nos diâmetros das fibrilas até ao final da prenhez, no D18, com a birrefringência variando de esverdeado a alaranjado nas ênteses analisadas. Durante o pós-parto, as fibras mostraram-se de birrefringência de coloração esverdeada e amarelada, tanto em animais primíparos quanto em múltiparos, corroborando a diminuição nos diâmetros das fibrilas colágenas no 3dpp e no 21dpp nas ênteses analisadas.

Portanto, nossos resultados indicam que, embora não haja o restabelecimento da cartilagem em animais múltiparos senescentes, a êntese da sínfise púbica desses animais sofre remodelação tecidual. Essa hipótese é suportada pela alteração de fenótipo celular, redução do diâmetro das fibrilas, como similarmente descrito por Consonni e colaboradores (2012) para o Llp e pela presença de *crimps*, os quais estudos anteriores tem mostrado que *crimps* formados no Llp em animais primíparos, é uma das consequências da remodelação tecidual durante a prenhez (Pinheiro *et al.*, 2004). Dessa forma, os ensaios morfológicos até então empregadas nesse trabalho podem fornecer bases para compreender as alterações que resultam em POP, onde os principais fatores associados são o parto vaginal e o envelhecimento (Delancey *et al.*, 2008; Abramowitch *et al.*, 2009).

Nossos dados corroboram com as descrições de que os processos fisiológicos impactados pela paridade e pelo parto culminam nas adaptações drásticas do canal do parto e do assoalho pélvico como detalhado por outros autores (Mant *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 2006). Complementarmente ao estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (Consonni *et al.*, 2012), as análises morfológicas e morfométricas deste trabalho demonstram que, durante a sexta prenhez e o pós-parto, até o 21dpp, o fenótipo celular é sugestivo de resposta aos estímulos da prenhez e do pós-parto em camundongos múltiparos senescentes, contudo as células e a matriz extracelular presentes aparentam características de perda da capacidade de retorno tecidual no pós-parto, uma vez que após o primeiro parto, o tecido fibrocartilaginoso é restaurado, e a articulação interpúbica rapidamente se fecha, aproximando-se das dimensões de um animal não prenhe (Consonni *et al.*, 2012 e Moraes *et al.*, 2004). O restabelecimento do tecido fibrocartilaginoso ocorre devido à expressão tempo-dependente de marcadores de linhagem condrocítica (Castelucci *et al.*, 2018) e a expressão gênica regulada temporalmente tem sido associada ao desenvolvimento funcional da êntese (Jensen *et al.*, 2018).

As vias de sinalização de TGF- β , BMP e Wnt são imprescindíveis para a diferenciação dos condrócitos durante a condrogênese no período de desenvolvimento embrionário de vertebrados. A inibição dessas vias pode levar à alteração da expressão de marcadores de células progenitoras osteocondrais (Kannu *et al.*, 2009), como os fatores de transcrição *Sox-9* e *Runx-2* que, além de importantes para a diferenciação de células progenitoras osteocondrais, são necessários para a formação da cartilagem articular (Lefebvre e Smits 2005; Wuelling e Vortkamp 2011). Castelucci e colaboradores (2018) sugeriram que a expressão diferencial de *Sox-9*, *Col2a1*, *DCX* e *Runx-2* em células alongadas ou arredondadas próximas à região do osso púbico, durante o remodelamento da sínfise púbica de animais primíparos, pode ser indicativo da presença de nicho de células progenitoras osteocondrais em estado transitório, permitindo o comprometimento a um ou mais tipos celulares segundo a sinalização molecular. Entretanto, nossos resultados indicam que, em razão da idade e da paridade, esse nicho de células progenitoras na êntese, identificados por marcadores condrogênicos e osteogênicos, encontra-se reduzido ou ausente em animais múltiparos senescentes durante e após a sexta prenhez.

A expressão de *Sox-9* ocorre durante todo o processo de diferenciação dos condrócitos na cartilagem em desenvolvimento desde o período embrionário em vertebrados e permanece expresso em condrócitos até a hipertrofia nas placas de crescimento e durante a vida adulta na cartilagem articular (Schafer *et al.*, 1996), assim como a expressão de *Runx-2* auxilia na regulação desta diferenciação induzindo a hipertrofia dos condrócitos, durante o desenvolvimento embrionário de camundongos (Enomoto, *et al.*, 2000; Wang, *et al.*, 2005; Dong, *et al.*, 2006). Nossas análises de PCR em tempo real na articulação interpúbica mostraram que, nos animais primíparos, enquanto a expressão gênica de *Sox-9* mostrou-se elevada, a de *Runx-2* apresentou-se reduzida até ao final da prenhez e, durante o pós-parto, ocorreu aumento significativo de *Runx-2* e de *Sox-9* no 3dpp, e redução significativa de ambos no 21dpp. Adicionalmente, a diferenciação das células em linhagem condrocítica, durante o desenvolvimento ósseo em vertebrados e o remodelamento ósseo ao longo da vida pós-natal, mostra-se regulada pela sinalização de *Shh* (Yang *et al.*, 2015). Assim, nossos achados confirmaram o aumento significativo da expressão de *Shh* no 3dpp e no 21dpp em animais primíparos. Desta forma, o perfil de expressão gênica de *Sox-9*, de *Runx-2* e de *Shh*, na articulação interpúbica, em animais primíparos, corrobora o processo de remodelação da sínfise púbica evidenciado na microscopia – o restabelecimento da articulação após o primeiro parto, com o retorno da fibrocartilagem entre os coxins de cartilagem hialina e com a reaproximação dos ossos púbicos.

Por outro lado, em animais múltiparos, a regulação temporal da expressão gênica de *Sox-9*, de *Runx-2* e de *Shh* na articulação interpúbica diferiu daquela encontrada nos animais primíparos. Cheng e Genever (2010) sugeriram que *Runx-2* pode suprimir *Sox-9* durante o

processo de diferenciação de condrócitos humanos em ensaios *in vitro* com cultura celular primária. Ainda, camundongos com mutações homozigóticas em *Runx-2* apresentaram retardo na ossificação durante o seu desenvolvimento embrionário (Komori, *et al.*, 1997; Otto, *et al.*, 1997). Nossos resultados sugerem que, embora haja níveis reduzidos na expressão de *Sox-9*, de *Runx-2* e de *Shh* ao longo da sexta prenhez e no pós-parto, há expressão tardia de *Sox-9* no início do pós-parto. Tais resultados sugerem que na articulação interpúbica pode ocorrer estímulo tardio na manutenção de células de perfil condrocítico, em razão do baixo nível de expressão de *Shh* e pela dominância de *Sox-9* em relação ao nível de expressão de *Runx-2*. Essa hipótese é suportada, pois estudos tem mostrado que o *Shh* está relacionado à formação óssea de camundongos durante o desenvolvimento embrionário e o período pós-natal (Kimura e Curran 2008) e, adicionalmente, a elevação no nível de expressão de *Sox-9* em relação à de *Runx-2*, durante o pós-parto, sugere maior estímulo para a diferenciação em células da linhagem condrocítica durante a remodelação da articulação interpúbica (Castelucci *et al.*, 2018).

A regulação espaço-temporal da expressão proteica de RUNX-2 e de SOX-9, é necessária durante a formação óssea no período embrionário de camundongos (Wright *et al.*, 1995; Ducky *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2005). Assim, no que diz respeito à imunolocalização espaço temporal de SOX-9 e de RUNX-2 na êntese da articulação interpúbica de fêmeas primíparas, durante o decorrer da prenhez, houve intensa marcação no D18 de ambos os marcadores, com redução no pós-parto, onde poucas células apresentaram imunomarcação próximas ao osso púbico no 21dpp. Nossos dados indicam, em animais primíparos, que a localização da expressão proteica de SOX-9 e de RUNX-2 são necessários durante a formação e o estabelecimento da êntese, bem como na formação da fibrocartilagem entre os coxins de cartilagem hialina no retorno pós-parto, de modo complementar ao descrito por Castelucci e colaboradores (2018). Essa hipótese é suportada, pois durante o período embrionário de camundongos, a expressão de SOX-9 auxilia a diferenciação de condroblastos e a formação de cartilagem, enquanto RUNX-2 contribui para a diferenciação e a proliferação de osteoblastos (Zhou *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2004).

Por outro lado, em animais múltiparos, ficou evidente a sutil marcação de SOX-9 apenas no D18, reduzindo sua marcação no pós-parto. Enquanto RUNX-2 mostrou gradual redução em sua marcação até o pós-parto. Dado que SOX-9 e RUNX-2 são necessários para o desenvolvimento, a homeostase, a remodelação e o reparo tecidual das ênteses fibrocartilaginosas de tendões de camundongos (Thomopoulos *et al.*, 2010), nossos achados podem indicar que o número de partos e a idade alteram tanto o perfil da expressão proteica de SOX-9 e RUNX-2 na êntese nos animais múltiparos senescentes quanto os perfis condrogênicos e osteogênicos da população celular da entese, possivelmente comprometendo o restabelecimento da fibrocartilagem e dos coxins de cartilagem hialina.

Além de necessários para diferenciação de progenitores osteocondrais, *Sox-9* e *Runx-2* controlam ainda a transcrição dos níveis de *DCX* e *Gdf5* (fator de crescimento/diferenciação 5), os quais desempenham papéis importantes no desenvolvimento articular durante o período embrionário de vertebrados (Dyment *et al.*, 2015; Stein *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006; Carroll *et al.*, 2013). Nossos dados da expressão gênica de *DCX* na articulação interpúbica em animais primíparos mostram sua redução no D18 com aumento significativo no pós-parto e, em múltiparos senescentes, não há variação da sua expressão ao longo da prenhez e do pós-parto. Sendo o *DCX* expresso nos condrócitos articulares e em células comprometidas na linhagem celular condrocítica (Ge *et al.*, 2014), nossos dados sugerem, que a expressão gênica de *DCX* se correlaciona à diferenciação dos condrócitos no restabelecimento da fibrocartilagem entre os coxins da cartilagem hialina no pós-parto das fêmeas primíparas, diferentemente do encontrado nos animais múltiparos e senescentes.

Esses dados corroboram com a imunolocalização de *DCX* específica na região da êntese no pós-parto, sugerindo a presença de um nicho de células que expressam *DCX* próximas ao osso púbico em fêmeas primíparas, diferentemente do encontrado em fêmeas múltiparas senescentes, as quais apresentaram imunomarcção de *DCX* na êntese durante a prenhez, entretanto mostraram redução qualitativa da imunomarcção na êntese durante o pós-parto, sugerindo a redução de células comprometidas com a diferenciação em condrócitos articulares nessa região da articulação interpúbica.

Estudos *in vitro* de cultura celular primária de condrócitos da cartilagem articular de humanos mostraram que o *Sox-9* é responsável por manter o fenótipo dos condrócitos e por regular a expressão de *Col2a1* (Shaban *et al.*, 2011). Nossos resultados de expressão gênica e de imunolocalização proteica de *COL2A1*, em fêmeas primíparas mostraram o aumento da expressão gênica no D15, redução no D18, e retorno a níveis similares ao D12 no 21dpp, além de imunomarcção de células próximas ao OP, de modo similar à imunolocalização do *SOX-9*. Esses resultados corroboram os descritos por Castelucci e colaboradores (2018), os quais mostraram marcação de nicho de células próximas ao OP com expressão de *COL2A1* e de *Sox-9* no 5dpp e no 10dpp, favorecendo a diferenciação das células progenitoras em condrócitos, conforme necessário para o retorno do tecido cartilaginoso da SP.

Por outro lado, a análise das fêmeas múltiparas senescentes apresenta baixa expressão e imunolocalização de colágeno do tipo II durante a prenhez e, no pós-parto, em 21dpp, imunomarcção de poucas células próximas ao OP e ausência de população celular imunomarcadas que expressam *SOX-9* na êntese. Ensaios *in vitro* mostraram células que deixaram de apresentar características fenotípicas de condrócitos e apresentaram baixa expressão de colágeno do tipo II (Benya *et al.*, 1978), o principal componente fibrilar da MEC da cartilagem hialina (Aigner e Stove 2003). Dado que o *Sox-9* pode regular genes capazes de codificar proteínas presentes na MEC, como o gene *Col2a1* que é responsável por codificar

colágeno do tipo II, importante para diferenciação dos condroblastos e específico para tecidos cartilagosos (Stokes *et al.*, 2001; Yasuda *et al.*, 2017), nossos resultados indicam alterações com redução da expressão gênica e proteica de moléculas-chave da manutenção de população celular progenitora de linhagem condrocítica, capazes de se diferenciar durante o restabelecimento dos coxins de cartilagem hialina da sínfise púbica observado nas fêmeas primíparas.

Ainda no que diz respeito à MEC, nossas análises de *Col10a1* na articulação interpúbica mostram aumento significativo na sua expressão gênica no D15 de fêmeas primíparas, mostrando-se essencial durante a formação da êntese e do Llp, onde há presença de condrocitos hipertróficos. Em contrapartida, nos demais dias de estudo analisados nas fêmeas primíparas e nas múltiparas senescentes durante a prenhez e o pós-parto, a expressão gênica de colágeno do tipo X é reduzida, possível consequência da ausência dos coxins de cartilagem hialina completamente formados e diferenciados, já que o colágeno do tipo X é somente sintetizado e depositado em zonas hipertróficas de placas de crescimento ativas de vertebrados, é removido à medida que a ossificação endocondral continua durante os períodos embrionário e pós-natal, e têm sua expressão reduzida à medida que a ossificação endocondral progride (Linsenmayer *et al.*, 1988). Assim, complementarmente aos dados anteriores obtidos para Sox-9, Runx-2, Shh, DCX e Col2a1, a expressão gênica de *Col10a1* mostra-se presente apenas no período de formação da êntese e do Llp em animais primíparos, enquanto a sua baixa expressão corrobora a hipótese de que, após sucessivas prenhez, a articulação interpúbica dos animais múltiparos senescentes apresenta marcadores de condrogênese e osteogênese significativamente reduzidos nas populações celulares, especialmente aquela encontrada na êntese, já que nos animais primíparos, a êntese apresenta-se como nicho essencial de regulação espaço-temporal para a formação do Llp durante a prenhez e o retorno da fibrocartilagem no pós-parto para que haja o restabelecimento da articulação interpúbica.

Identificamos um padrão de modificações tempo e espaço dependentes no que diz respeito ao fenótipo das populações celulares, à disposição e à composição da MEC, à imunolocalização e à expressão gênica de marcadores condrogênicos e osteogênicos na êntese da articulação interpúbica de animais primíparos e múltiparos senescentes. Comparativamente, esse padrão mostrou-se alterado nos camundongos múltiparos senescentes provenientes de matrizes reprodutivas, corroborando a hipótese de que os efeitos da paridade e da idade podem impactar a condrogênese e a osteogênese da êntese na sínfise púbica de camundongos durante a sexta prenhez e o seu pós-parto.

Dado que o envelhecimento é um dos fatores para a menor adaptação dos tecidos às suas funções (Freemont *et al.*, 2007), nossos achados sugerem que a paridade e a idade podem impactar a condrogênese e a osteogênese da êntese na sínfise púbica de

camundongos durante a sexta prenhez e o seu pós-parto. Desse modo, nosso grupo de pesquisa, pelas evidências celulares, matriciais e moleculares, destaca esse modelo animal por apresentar bases para a compreensão dos processos fisiopatológicos da prenhez, como aquelas que levam ao enfraquecimento de órgãos pélvicos e de estruturas suportes desses órgãos, especificamente a sínfise púbica e o canal de parto duro. Esse modelo mostra-se importante para compreender alterações em humanos, evidenciando possíveis modificações de suporte e de estabilidade dos tecidos conjuntivos maternos devido à incapacidade de se recuperar completamente após sucessivos eventos, apesar do sucesso reprodutivo – com parto e nascimento vaginal da prole.

6. CONCLUSÕES

Nosso trabalho evidenciou um modificações tempo e espaço dependentes no que diz respeito ao fenótipo das populações celulares, à disposição e à composição da MEC, à imunolocalização e à expressão gênica de marcadores condrogênicos e osteogênicos na êntese da sínfise púbica de camundongos C57BL/6 primíparos e múltiparos senescentes na sexta prenhez. Em animais múltiparos senescentes, esse padrão mostrou-se alterado quando comparado aos primíparos. Nossas análises permitem inferir que, na articulação interpúbica, a êntese mostra-se como uma região de transição dinâmica, com progressão durante a prenhez e regressão durante o pós-parto em animais primíparos. Em fêmeas múltiparas, essa estrutura encontra-se presente ao longo da prenhez e do pós-parto, com as regiões PR e PD pouco perceptíveis nos dias de estudo identificadas nos animais primíparos, mas com células de fenótipos aparentemente responsivos aos estímulos da prenhez.

As análises de expressão gênica e de imuno-histoquímica evidenciaram a regulação espaço-temporal dos fatores condrogênicos e osteogênicos *Sox-9*, *Col2a1*, *Dcx*, *Runx-2*, *Col10a1* e *Shh* durante a formação da êntese e do Llp na prenhez e durante o retorno dos coxins de cartilagem hialina e da fibrocartilagem no pós-parto de fêmeas primíparas. Embora nossas análises morfológicas mostraram a população celular da êntese de animais múltiparos fenotipicamente ativa, modificando-se durante a sexta prenhez, as análises de expressão gênica e de imuno-histoquímica evidenciaram a redução do padrão de regulação espaço-temporal desses fatores. Nossos dados indicaram que animais múltiparos senescentes apresentam marcadores de condrogênese e osteogênese significativamente reduzidos nas populações celulares, especialmente aquela encontrada na êntese, já que nos animais primíparos, a êntese apresenta-se como nicho essencial de regulação espaço-temporal para a formação do Llp durante a prenhez e a recuperação da fibrocartilagem no pós-parto para que haja o restabelecimento da articulação interpúbica.

Desse modo, nosso grupo de pesquisa, pelas evidências celulares, matriciais e moleculares, destaca o modelo animal das matrizes reprodutivas por apresentar bases para a compreensão dos processos fisiopatológicos da prenhez, como aquelas que levam ao enfraquecimento de órgãos pélvicos e estruturas suportes desses órgãos, especificamente a sínfise púbica e o canal de parto duro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMOWITZ, S. D. et al. Tissue mechanics, animal models, and pelvic organ prolapse: A review. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 144, p. S146–S158, maio 2009.
2. AHMED, S.; NOWLAN, N. Initiation and emerging complexity of the collagen network during prenatal skeletal development. **European Cells and Materials**, v. 39, p. 136–155, 27 fev. 2020.
3. AIGNER, T. Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1569–1593, 28 nov. 2003.
4. AKIYAMA, H. et al. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. **Genes & Development**, v. 16, n. 21, p. 2813–2828, 1 nov. 2002.
5. ALMEIDA, M. et al. Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 1, p. 135–187, jan. 2017.
6. ALPERIN, M. et al. LOXL1 deficiency negatively impacts the biomechanical properties of the mouse vagina and supportive tissues. **International Urogynecology Journal**, v. 19, n. 7, p. 977–986, 12 jul. 2008.
7. AN, B.-S. et al. Mouse calbindin-D9k gene expression in the uterus during late pregnancy and lactation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 205, n. 1–2, p. 79–88, jul. 2003.
8. APOSTOLAKOS, J. et al. The enthesis: a review of the tendon-to-bone insertion. **Muscles, ligaments and tendons journal**, v. 4, n. 3, p. 333–42, jul. 2014.
9. ASHRAF, S. et al. Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 2, p. 196–205, fev. 2016.
10. BAHNEY, C. S. et al. The Multifaceted Role of the Vasculature in Endochondral Fracture Repair. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, 5 fev. 2015.
11. BAILEY, A. J.; PAUL, R. G.; KNOTT, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 106, n. 1–2, p. 1–56, dez. 1998.
12. BAILEY, A. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 122, n. 7, p. 735–755, 31 maio 2001.
13. BARBER, M. D. Pelvic organ prolapse. **BMJ**, p. i3853, 20 jul. 2016.
14. BEAULIEU, M. L. et al. Quantitative comparison of the microscopic anatomy of the human ACL femoral and tibial entheses. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 33, n. 12, p. 1811–1817, dez. 2015.
15. BECKER, I.; WOODLEY, S. J.; STRINGER, M. D. The adult human pubic symphysis: a systematic review. **Journal of Anatomy**, v. 217, n. 5, p. 475–487, nov. 2010.
16. BENJAMIN, M. Anatomy and biochemistry of entheses. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 59, n. 12, p. 995–999, 1 dez. 2000.
17. BENJAMIN, M. et al. The “enthesis organ” concept: Why enthesopathies may not present as focal insertional disorders. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 10, p. 3306–3313, out. 2004.
18. BENJAMIN, M. et al. The skeletal attachment of tendons—tendon ‘entheses.’ **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 133, n. 4, p. 931–945, dez. 2002.

19. BENJAMIN, M. et al. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. **Journal of Anatomy**, v. 208, n. 4, p. 471–490, abr. 2006.
20. BENJAMIN, M.; RALPHS, J. R. Entheses: the bony attachments of tendons and ligaments. **Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia**, v. 106, n. 2 Suppl 1, p. 151–7, 2001.
21. BENJAMIN, M.; RALPHS, J. R. Fibrocartilage in tendons and ligaments - an adaptation to compressive load. **Journal of Anatomy**, v. 193, n. 4, p. 481–494, nov. 1998.
22. BENYA, P. D.; PADILLA, S. R.; NIMNI, M. E. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. **Cell**, v. 15, n. 4, p. 1313–1321, dez. 1978.
23. BERENDSEN, A. D.; OLSEN, B. R. Bone development. **Bone**, v. 80, p. 14–18, nov. 2015.
24. BI, W. et al. Sox9 is required for cartilage formation. **Nature Genetics**, v. 22, n. 1, p. 85–89, maio 1999.
25. BLITZ, E. et al. Bone Ridge Patterning during Musculoskeletal Assembly Is Mediated through SCX Regulation of Bmp4 at the Tendon-Skeleton Junction. **Developmental Cell**, v. 17, n. 6, p. 861–873, dez. 2009.
26. BOYS, A. J. et al. Next generation tissue engineering of orthopedic soft tissue-to-bone interfaces. **MRS Communications**, v. 7, n. 3, p. 289–308, 3 set. 2017.
27. BRANDON, C. et al. Pubic bone injuries in primiparous women: magnetic resonance imaging in detection and differential diagnosis of structural injury. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 39, n. 4, p. 444–451, abr. 2012.
28. BUCKLEY, M. R. et al. Distributions of types I, II and III collagen by region in the human supraspinatus tendon. **Connective Tissue Research**, v. 54, n. 6, p. 374–379, 2 nov. 2013.
29. BUHIMSCHI, C. S. et al. Genetic background affects the biomechanical behavior of the postpartum mouse cervix. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 200, n. 4, p. 434.e1-434.e7, abr. 2009.
30. CARLEY, M. E. et al. Obstetric history in women with surgically corrected adult urinary incontinence or pelvic organ prolapse. **The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists**, v. 6, n. 1, p. 85–89, fev. 1999.
31. CARROLL, S. H.; RAVID, K. Differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and chondrocytes: a focus on adenosine receptors. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 15, p. e1, 14 fev. 2013.
32. CASTELUCCI, B. G. et al. Time-dependent regulation of morphological changes and cartilage differentiation markers in the mouse pubic symphysis during pregnancy and postpartum recovery. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195304, 5 abr. 2018.
33. CHAMPLIN, A. K.; DORR, D. L.; GATES, A. H. Determining the Stage of the Estrous Cycle in the Mouse by the Appearance of the Vagina. **Biology of Reproduction**, v. 8, n. 4, p. 491–494, 1 maio 1973.
34. CHEAH, K. S. et al. Expression of the mouse alpha 1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development. **Development**, v. 111, n. 4, p. 945–953, 1 abr. 1991.
35. CHENG, A.; GENEVER, P. G. SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 12, p. 2680–2689, dez. 2010.
36. CHEUNG, T. H.; RANDO, T. A. Molecular regulation of stem cell quiescence. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 6, p. 329–340, 23 jun. 2013.

37. CHOI, K. H.; HONG, J. Y. Management of Pelvic Organ Prolapse. **Korean Journal of Urology**, v. 55, n. 11, p. 693, 2014.
38. CONSONNI, S. R. et al. Elastic Fiber Assembly in the Adult Mouse Pubic Symphysis During Pregnancy and Postpartum1. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 5, 1 maio 2012b.
39. CONSONNI, S. R. et al. Recovery of the pubic symphysis on primiparous young and multiparous senescent mice at postpartum. **Histology and histopathology**, v. 27, n. 7, p. 885–96, 2012a.
40. CUNNINGHAM, P. M. et al. Patterns of Bone and Soft-Tissue Injury at the Symphysis Pubis in Soccer Players: Observations at MRI. **American Journal of Roentgenology**, v. 188, n. 3, p. W291–W296, mar. 2007.
41. DE ARAUJO, M. P. et al. Pelvic floor disorders among indigenous women living in Xingu Indian Park, Brazil. **International Urogynecology Journal**, v. 20, n. 9, p. 1079–1084, 15 set. 2009.
42. DELANCEY, J. O. L. et al. Comparison of Levator Ani Muscle Defects and Function in Women With and Without Pelvic Organ Prolapse. **Obstetrics & Gynecology**, v. 109, n. 2, Part 1, p. 295–302, fev. 2007.
43. DELANCEY, J. O. L. et al. Graphic integration of causal factors of pelvic floor disorders: an integrated life span model. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 199, n. 6, p. 610.e1-610.e5, dez. 2008.
44. DELANCEY, J. O. The anatomy of the pelvic floor. **Current opinion in obstetrics & gynecology**, v. 6, n. 4, p. 313–6, ago. 1994.
45. DELANCEY, J. The appearance of levator ani muscle abnormalities in magnetic resonance images after vaginal delivery. **Obstetrics & Gynecology**, v. 101, n. 1, p. 46–53, jan. 2003.
46. DONG, Y.-F. et al. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. **Journal of Cellular Physiology**, v. 208, n. 1, p. 77–86, jul. 2006.
47. DREWES, P. G. et al. Pelvic Organ Prolapse in Fibulin-5 Knockout Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 2, p. 578–589, fev. 2007.
48. DUCY, P. et al. Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 747–754, maio 1997.
49. DYMENT, N. A. et al. Gdf5 progenitors give rise to fibrocartilage cells that mineralize via hedgehog signaling to form the zonal enthesis. **Developmental Biology**, v. 405, n. 1, p. 96–107, set. 2015.
50. ENOMOTO, H. et al. Cbfa1 Is a Positive Regulatory Factor in Chondrocyte Maturation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 8695–8702, mar. 2000.
51. EYAL, S. et al. Bone morphology is regulated modularly by global and regional genetic programs. **Development**, 1 jan. 2019.
52. FALLAS, J. A.; GAUBA, V.; HARTGERINK, J. D. Solution Structure of an ABC Collagen Heterotrimer Reveals a Single-register Helix Stabilized by Electrostatic Interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 39, p. 26851–26859, set. 2009.
53. FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 15 dez. 2010.
54. FREEMONT, A.; HOYLAND, J. Morphology, mechanisms and pathology of musculoskeletal ageing. **The Journal of Pathology**, v. 211, n. 2, p. 252–259, jan. 2007.

55. GALATZ, L. M. et al. Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 24, n. 3, p. 541–550, mar. 2006.
56. GARCIA, E. et al. Hyaluronan involvement in the changes of mouse interpubic tissue during late pregnancy and post-partum. **Cell Biology International**, v. 32, n. 8, p. 913–919, ago. 2008.
57. GARDNER, W. U. Sexual dimorphism of the pelvis of the mouse, the effect of estrogenic hormones upon the pelvis and upon the development of scrotal hernias. **American Journal of Anatomy**, v. 59, n. 3, p. 459–483, set. 1936.
58. GATHERCOLE, L. J.; KELLER, A. Crimp Morphology in the Fibre-Forming Collagens. **Matrix**, v. 11, n. 3, p. 214–234, jun. 1991.
59. GILL, E. J.; HURT, W. G. PATHOPHYSIOLOGY OF PELVIC ORGAN PROLAPSE. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 757–769, dez. 1998.
60. GÜREL, H.; GÜREL, S. Pelvic relaxation and associated risk factors, The results of logistic regression analysis. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 78, n. 4, p. 290–293, jan. 1999.
61. HANDSFIELD, G. G.; SLANE, L. C.; SCREEN, H. R. C. Nomenclature of the tendon hierarchy: An overview of inconsistent terminology and a proposed size-based naming scheme with terminology for multi-muscle tendons. **Journal of Biomechanics**, v. 49, n. 13, p. 3122–3124, set. 2016.
62. HASTON, W. S.; SHIELDS, J. M.; WILKINSON, P. C. The orientation of fibroblasts and neutrophils on elastic substrata. **Experimental Cell Research**, v. 146, n. 1, p. 117–126, jun. 1983.
63. HATTORI, T. et al. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. **Development**, v. 137, n. 6, p. 901–911, 15 mar. 2010.
64. HENDRIX, S. L. et al. Pelvic organ prolapse in the women's health initiative: Gravity and gravidity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 186, n. 6, p. 1160–1166, jun. 2002.
65. HISS, J. et al. Aging of Wound Healing in an Experimental Model in Mice. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 9, n. 4, p. 310–312, dez. 1988.
66. JENSEN, P. T.; LAMBERTSEN, K. L.; FRICH, L. H. Assembly, maturation, and degradation of the supraspinatus enthesis. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, v. 27, n. 4, p. 739–750, abr. 2018.
67. JOAZEIRO, P.P., et al., Peri-partum changes to mouse pubic symphysis, in The guide to investigation of mouse pregnancy, A. Croy, et al., Editors. 2014, **Elsevier/Academic Press**: London. p. 403-417.
68. JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, v. 74, n. 1, p. 153–156, 1982.
69. KANNU, P. et al. Employing molecular genetics of chondrodysplasias to inform the study of osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 2, p. 325–334, fev. 2009.
70. KIMURA, H.; NG, J. M. Y.; CURRAN, T. Transient Inhibition of the Hedgehog Pathway in Young Mice Causes Permanent Defects in Bone Structure. **Cancer Cell**, v. 13, n. 3, p. 249–260, mar. 2008.
71. KOMORI, T. et al. Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturation Arrest of Osteoblasts. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 755–764, maio 1997.

72. KOMURO, T. Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast-like cells. **Anatomy and Embryology**, v. 182, n. 2, ago. 1990.
73. KÖNIGSBERG, M. et al. Physiological deterioration associated with breeding in female mice: A model for the study of senescence and aging. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 695–701, abr. 2007.
74. KOZHEMYAKINA, E.; LASSAR, A. B.; ZELZER, E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. **Development**, v. 142, n. 5, p. 817–831, 1 mar. 2015.
75. LEFEBVRE, V.; SMITS, P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 75, n. 3, p. 200–212, set. 2005.
76. LINSENMAYER, T. F.; EAVEY, R. D.; SCHMID, T. M. Type X Collagen: A Hypertrophic Cartilage-Specific Molecule. **Pathology and Immunopathology Research**, v. 7, n. 1–2, p. 14–19, 1988.
77. LIU, C.-F. et al. Spatial and Temporal Expression of Molecular Markers and Cell Signals During Normal Development of the Mouse Patellar Tendon. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, n. 5–6, p. 598–608, mar. 2012.
78. LIU, S. H. et al. Morphology and Matrix Composition During Early Tendon to Bone Healing. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 339, p. 253–260, jun. 1997.
79. LIU, X. et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase–like 1 protein. **Nature Genetics**, v. 36, n. 2, p. 178–182, 25 fev. 2004.
80. LU, H. H.; THOMOPOULOS, S. Functional Attachment of Soft Tissues to Bone: Development, Healing, and Tissue Engineering. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 15, n. 1, p. 201–226, 11 jul. 2013.
81. LUKACZ, E. S. et al. Parity, Mode of Delivery, and Pelvic Floor Disorders. **Obstetrics & Gynecology**, v. 107, n. 6, p. 1253–1260, jun. 2006.
82. MANT, J.; PAINTER, R.; VESSEY, M. Epidemiology of genital prolapse: observations from the Oxford Family Planning Association study. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 104, n. 5, p. 579–585, maio 1997.
83. MIAO, D. Osteoblast-derived PTHrP is a potent endogenous bone anabolic agent that modifies the therapeutic efficacy of administered PTH 1-34. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 9, p. 2402–2411, 25 ago. 2005.
84. MILLER, J. M. et al. MRI Findings in Patients Considered High Risk for Pelvic Floor Injury Studied Serially After Vaginal Childbirth. **American Journal of Roentgenology**, v. 195, n. 3, p. 786–791, set. 2010.
85. MONTES, G. STRUCTURAL BIOLOGY OF THE FIBRES OF THE COLLAGENOUS AND ELASTIC SYSTEMS. **Cell Biology International**, v. 20, n. 1, p. 15–27, jan. 1996.
86. MORAES, S. G. et al. Phenotypic modulation of fibroblastic cells in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum. **Cell and Tissue Research**, v. 315, n. 2, p. 223–231, 1 fev. 2004.
87. MORAES, S.G *et al.* Differential distribution of elastic system fibers in the pubic symphysis of mice during pregnancy, partum and post-partum. **Braz J Morphol Sci**, [S.l.], v. 2, n. 20, p. 85–92, 2003.
88. MORO, C. F. et al. High iNOS mRNA and protein localization during late pregnancy suggest a role for nitric oxide in mouse pubic symphysis relaxation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, n. 4, p. 272–282, abr. 2012.

89. NORTON, P. A. Pelvic Floor Disorders: The Role of Fascia and Ligaments. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 36, n. 4, p. 926–938, dez. 1993.
90. O'BOYLE, A. L. et al. Pelvic organ support in pregnancy and postpartum. **International Urogynecology Journal**, v. 16, n. 1, p. 69–72, 31 fev. 2005.
91. OTTO, F. et al. Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 765–771, maio 1997.
92. PARRY, D. A. D.; CRAIG, A. S. Collagen Fibrils During Development and Maturation and their Contribution to the Mechanical Attributes of Connective Tissue. **Collagen: Biochemistry And Biomechanics**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 1-23, jan. 1988.
93. PATEL, D. A. et al. Childbirth and pelvic floor dysfunction: An epidemiologic approach to the assessment of prevention opportunities at delivery. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 195, n. 1, p. 23–28, jul. 2006.
94. PATEL, S. et al. Integrating soft and hard tissues via interface tissue engineering. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 4, p. 1069–1077, 5 abr. 2018.
95. PERSIKOV, A. V. et al. Electrostatic Interactions Involving Lysine Make Major Contributions to Collagen Triple-Helix Stability. **Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 1414–1422, 1 fev. 2005.
96. PINHEIRO, M. C. et al. Histochemical and ultrastructural study of collagen fibers in mouse pubic symphysis during late pregnancy. **Micron**, v. 35, n. 8, p. 685–693, dez. 2004.
97. PINHEIRO, M. et al. Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in the mouse pubic symphysis during pregnancy. **Cell Biology International**, v. 29, n. 6, p. 458–471, jun. 2005.
98. RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, p. a004978–a004978, 1 jan. 2011.
99. RIZZINO, A.; WUEBBEN, E. L. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 6, p. 780–791, jun. 2016a.
100. RIZZINO, A.; WUEBBEN, E. L. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 6, p. 780–791, jun. 2016b.
101. RODEO, S. A. et al. Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 75, n. 12, p. 1795–1803, dez. 1993.
102. ROSA, R. G. et al. Changes of Large Molecular Weight Hyaluronan and Versican in the Mouse Pubic Symphysis Through Pregnancy¹. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 2, 1 fev. 2012.
103. ROSA, R. G. et al. Relaxation of the mouse pubic symphysis during late pregnancy is not accompanied by the influx of granulocytes. **Microscopy Research and Technique**, v. 71, n. 3, p. 169–178, mar. 2008.
104. ROSSETTI, L. et al. The microstructure and micromechanics of the tendon–bone insertion. **Nature Materials**, v. 16, n. 6, p. 664–670, 27 jun. 2017.
105. SCHAFER, A. J. et al. Campomelic Dysplasia with XY Sex Reversal: Diverse Phenotypes Resulting from Mutations in a Single Gene. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 785, n. 1, p. 137–149, jun. 1996.
106. SCHUTZ, H.; DONOVAN, E. R.; HAYES, J. P. Effects of parity on pelvic size and shape dimorphism in *Mus*. **Journal of Morphology**, v. 270, n. 7, p. 834–842, jul. 2009.

107. SCHWARTZ, A. G.; LONG, F.; THOMOPOULOS, S. Enthesis fibrocartilage cells originate from a population of Hedgehog-responsive cells modulated by the loading environment. **Development**, v. 142, n. 1, p. 196–206, 1 jan. 2015a.
108. SCHWARTZ, A. G.; LONG, F.; THOMOPOULOS, S. Enthesis fibrocartilage cells originate from a population of Hedgehog-responsive cells modulated by the loading environment. **Development**, v. 142, n. 1, p. 196–206, 1 jan. 2015b.
109. SHA'BAN, M *et al.* Sox-9 transient transfection enhances chondrogenic expression of osteoarthritic human articular chondrocytes in vitro: preliminary analysis. **Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 32-41, jan. 2011.
110. SHERWOOD, O. D. Relaxin's Physiological Roles and Other Diverse Actions. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 2, p. 205–234, 1 abr. 2004.
111. SILVA, M. J. *et al.* Early healing of flexor tendon insertion site injuries: Tunnel repair is mechanically and histologically inferior to surface repair in a canine model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 24, n. 5, p. 990–1000, 2 mar. 2006.
112. SMITH, L. *et al.* Tissue-Engineering Strategies for the Tendon/Ligament-to-Bone Insertion. **Connective Tissue Research**, v. 53, n. 2, p. 95–105, 20 abr. 2012.
113. SMITH, M. V. *et al.* Mechanical Properties and Microstructural Collagen Alignment of the Ulnar Collateral Ligament During Dynamic Loading. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 47, n. 1, p. 151–157, 29 jan. 2019.
114. SMITH, N. *et al.* Overlapping expression of Runx1(Cbfa2) and Runx2(Cbfa1) transcription factors supports cooperative induction of skeletal development. **Journal of Cellular Physiology**, v. 203, n. 1, p. 133–143, abr. 2005.
115. SPALAZZI, J. P. *et al.* Quantitative Mapping of Matrix Content and Distribution across the Ligament-to-Bone Insertion. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74349, 3 set. 2013.
116. STEIN, G. S. *et al.* Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. **Oncogene**, v. 23, n. 24, p. 4315–4329, 24 maio 2004.
117. STOFFEL, J. T. *et al.* Urinary Incontinence After Stress Incontinence Surgery: A Risk Factor for Depression. **Urology**, v. 73, n. 1, p. 41–46, jan. 2009.
118. SUMMERS, A. *et al.* The relationship between anterior and apical compartment support. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, n. 5, p. 1438–1443, maio 2006.
119. SUSPERREGUI, A. R. G. *et al.* BMP-2 regulation of PTHrP and osteoclastogenic factors during osteoblast differentiation of C2C12 cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 216, n. 1, p. 144–152, jul. 2008.
120. TARBIT, E. *et al.* Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. **Heart Failure Reviews**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 10 jan. 2019.
121. THOMAS, T. M. *et al.* Prevalence of urinary incontinence. **British medical journal**, v. 281, n. 6250, p. 1243–5, 8 nov. 1980.
122. THOMOPOULOS, S.; BIRMAN, V.; GENIN, G. M. (EDS.). **Structural Interfaces and Attachments in Biology**. New York, NY: Springer New York, 2013.
123. THOMOPOULOS, S.; GENIN, G. M.; GALATZ, L. M. The development and morphogenesis of the tendon-to-bone insertion - what development can teach us about healing -. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 10, n. 1, p. 35–45, mar. 2010.
124. THOMOPOULOS, S.; WILLIAMS, G. R.; SOSLOWSKY, L. J. Tendon to Bone Healing: Differences in Biomechanical, Structural, and Compositional Properties Due to a Range of

- Activity Levels. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 125, n. 1, p. 106–113, 1 fev. 2003a.
125. THOMOPOULOS, S.; WILLIAMS, G. R.; SOSLOWSKY, L. J. Tendon to Bone Healing: Differences in Biomechanical, Structural, and Compositional Properties Due to a Range of Activity Levels. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 125, n. 1, p. 106–113, 1 fev. 2003b.
 126. TIMMONS, B. C.; MAHENDROO, M. S. Timing of Neutrophil Activation and Expression of Proinflammatory Markers Do Not Support a Role for Neutrophils in Cervical Ripening in the Mouse¹. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 2, p. 236–245, 1 fev. 2006.
 127. TIMMONS, B.; AKINS, M.; MAHENDROO, M. Cervical remodeling during pregnancy and parturition. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 6, p. 353–361, jun. 2010.
 128. TINELLI, A. et al. Age-related pelvic floor modifications and prolapse risk factors in postmenopausal women. **Menopause**, v. 17, n. 1, p. 204–212, jan. 2010.
 129. VAN DONKELAAR, C. C.; HUISKES, R. The PTHrP–Ihh Feedback Loop in the Embryonic Growth Plate Allows PTHrP to Control Hypertrophy and Ihh to Regulate Proliferation. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, v. 6, n. 1–2, p. 55–62, 12 jan. 2007.
 130. WANG, Y. et al. Runx1/AML1/Cbfa2 Mediates Onset of Mesenchymal Cell Differentiation Toward Chondrogenesis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 9, p. 1624–1636, 23 maio 2005.
 131. WEISKIRCHEN, R.; WEISKIRCHEN, S.; TACKE, F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 65, p. 2–15, fev. 2019.
 132. WHELAN, A. et al. Collagen fibre orientation and dispersion govern ultimate tensile strength, stiffness and the fatigue performance of bovine pericardium. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 90, p. 54–60, fev. 2019.
 133. WIESLANDER, C. K. et al. Quantification of Pelvic Organ Prolapse in Mice: Vaginal Protease Activity Precedes Increased MOPQ Scores in Fibulin 5 Knockout Mice¹. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 3, p. 407–414, 1 mar. 2009.
 134. WIGHT, T. N.; KINSELLA, M. G.; QWARNSTRÖM, E. E. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. 793–801, out. 1992.
 135. WIGHT, T.N.; TOOLE, B. P.; HASCALL, V.C. Hyaluronan and the aggregating proteoglycans. **The Extracellular Matrix: An Overview**, Berlin, v. 2, n. 1, p. 147-195, 10 dez. 2010.
 136. WRIGHT, E. et al. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. **Nature Genetics**, v. 9, n. 1, p. 15–20, jan. 1995.
 137. WUELLING, M.; VORTKAMP, A. Chondrocyte Proliferation and Differentiation. In: [s.l: s.n.]. p. 1–11.
 138. YANG, J. et al. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. **International Journal of Oral Science**, v. 7, n. 2, p. 73–79, 29 jun. 2015.
 139. YANG, P. J.; TEMENOFF, J. S. Engineering Orthopedic Tissue Interfaces. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 15, n. 2, p. 127–141, jun. 2009.
 140. YANG, S. et al. Oriented collagen fiber membranes formed through counter-rotating extrusion and their application in tendon regeneration. **Biomaterials**, v. 207, p. 61–75, jul. 2019.

141. YEH, J.; KIM, B. Increasing Blunting of Inhibin Responses to Dynamic Ovarian Challenge Is Associated With Reproductive Aging in the Rat. **Reproductive Sciences**, v. 14, n. 1, p. 10–19, 5 jan. 2007.
142. YOSHIDA, C. A. et al. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of *Indian hedgehog*. **Genes & Development**, v. 18, n. 8, p. 952–963, 15 abr. 2004.
143. ZHAO, L. et al. Collagen Studies in Late Pregnant Relaxin Null Mice¹. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 697–703, 1 set. 2000.
144. ZHOU, G. et al. Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 50, p. 19004–19009, 12 dez. 2006.

8.1 Anexo 1: Nomenclatura dos genes e proteínas

Tabela 6. Nomenclatura dos genes e das proteínas utilizadas para a técnica de PCR em tempo real e imuno-histoquímica.

Gene	Nome da proteína	Abreviação da proteína
<i>Col2a1</i>	Colágeno do tipo II, alfa 1	COL2A1
<i>Dcx</i>	<i>Doublecortin neuronal migration protein</i>	DCX
<i>Sox-9</i>	<i>SOX-9 Transcription Factor</i>	SOX-9
<i>Runx-2</i>	<i>Runt-related transcription factor 2</i>	RUNX-2
<i>Shh</i>	<i>sonic hedgehog protein</i>	SHH
<i>Col10a1</i>	Colágeno do tipo X, alfa 1	COL10A1

8.2 Anexo 2: Controle negativo da reação de imuno-histoquímica

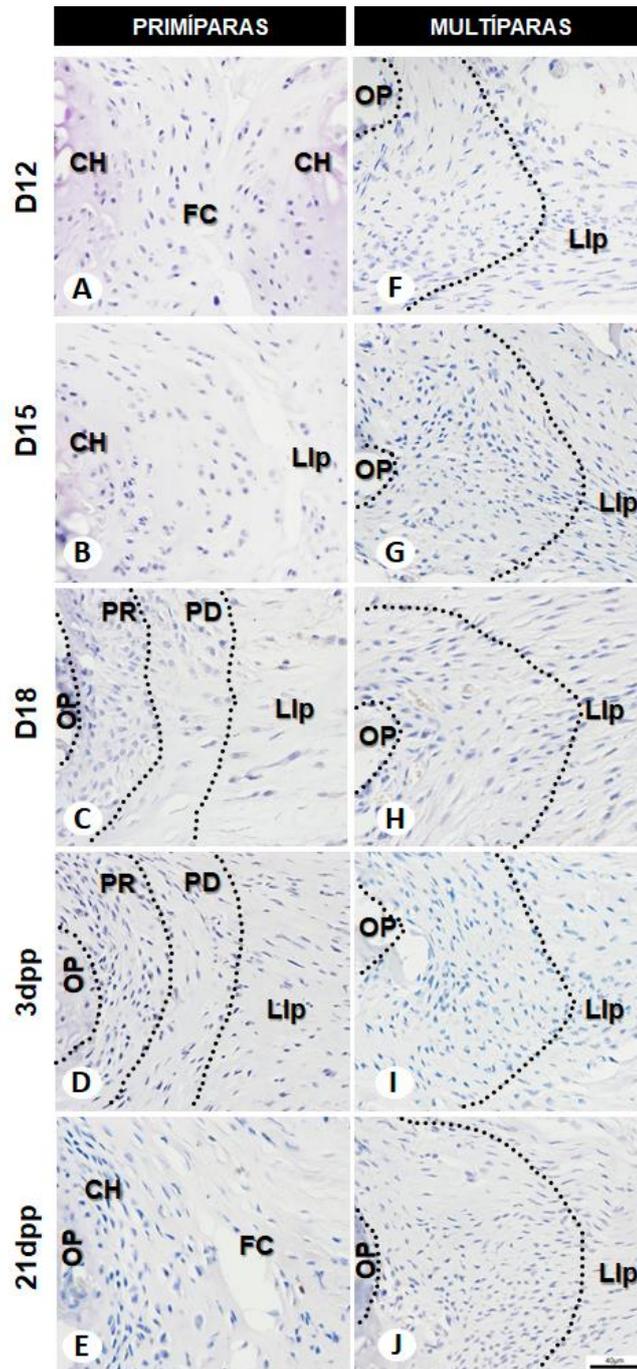


Figura 29. Fotomicrografias representativas dos controles negativos da reação imuno-histoquímica na articulação interpúbica em camundongos durante a prenhez e pós-parto de animais primíparas (A-D) e múltiparas senescentes (F-J). Os controles negativos foram realizados com as omissões dos anticorpos primários. Imuno-histoquímica com revelação por DAB e coloração de Hematoxilina de Harrys. Barra = 40µm.

8.2 Anexo 3: Certificado de legislação e procedimentos para utilização de animais em laboratório



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/UNICAMP

Certificamos que **LIZANDRA MAIA DE SOUSA** concluiu o curso online **Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório**, oferecido pelo **Instituto de Biologia da UNICAMP** e pela **Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP**.

Este certificado tem validade de 02 (dois) anos a partir da data de emissão.

Campinas, 11 de dezembro de 2019.

A handwritten signature in blue ink that reads "Wagner José Fávaro".

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Professor Assistente Doutor
Presidente da CEUA/UNICAMP

8.3 Anexo 4: Certificado e declaração de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNICAMP



CEUA/UNICAMP

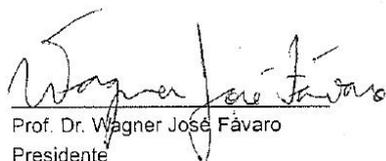
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da paridade e da idade na condrogênese e osteogênese na entese da sínfise púbica em camundongos durante o fim da prenhez e no pós-parto", registrada com o nº 5491-1/2020, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Sílvio Roberto Consonni e Lizandra Maia de Sousa, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 20/02/2020.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/04/2020 a 28/02/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	20/02/2020 a 28/02/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	3,00 Meses / 25,00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	7,00 Meses / 40,00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	108
Idade/Peso:	3,00 Meses / 25,00 Gramas
Sexo:	108 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	108
Idade/Peso:	7,00 Meses / 40,00 Gramas
Sexo:	108 Fêmeas
Origem:	CEMIB-UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Roedores da Biologia Tecidual (bloco H), DBBT/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 02 de abril de 2020.


 Prof. Dr. Wagner José Fávoro
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação do relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.