



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Leila Cristina Soares

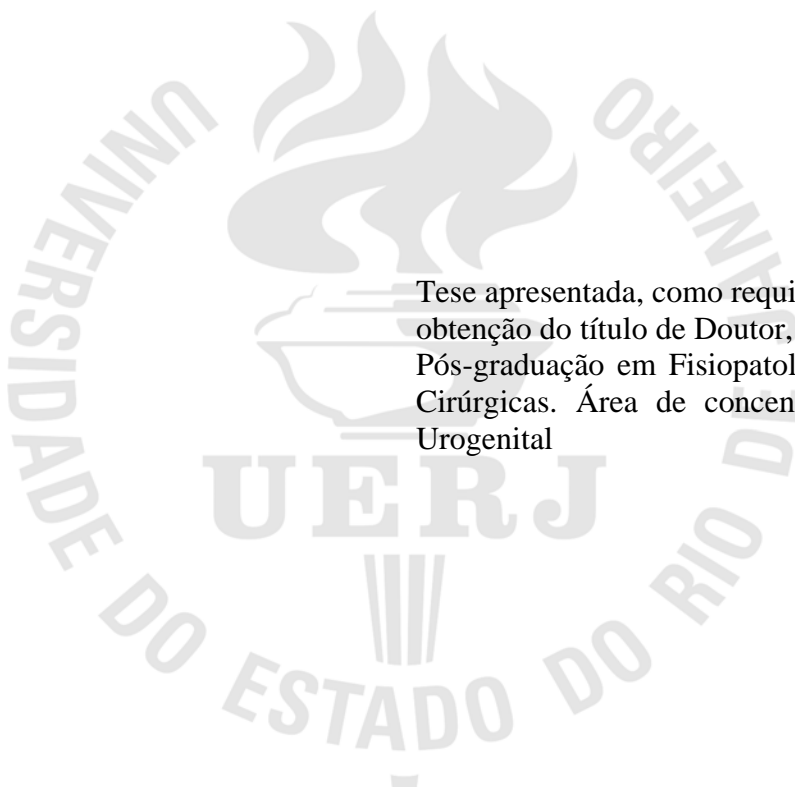
**Composição da matriz extracelular do ligamento cardinal de mulheres na
pós-menopausa com e sem prolapso uterino**

Rio de Janeiro

2011

Leila Cristina Soares

Composição da matriz extracelular do ligamento cardinal de mulheres na pós-menopausa com e sem prolapso uterino



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas. Área de concentração: Sistema Urogenital

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S676 Soares, Leila Cristina.

Composição da matriz extracelular do ligamento cardinal de mulheres na pós-menopausa com e sem prolapso uterino / Leila Cristina Soares.- 2011.

45 f.

Orientador : Luiz Eduardo Macedo Cardoso.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Colágeno - Teses. 2. Proteoglicanas - Teses. 3. Tecido elástico - Teses. 4. Glicosaminoglicanas - Teses. 5. Prolapso uterino - Teses. I. Cardoso, Luiz Eduardo Macedo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas III. Título.

CDU 611.664

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Leila Cristina Soares

Composição da matriz extracelular do ligamento cardinal de mulheres na pós-menopausa com e sem prolapso uterino

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas. Área de concentração: Sistema Urogenital

Aprovada em 19 de janeiro de 2011.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Carlos Augusto Pais Cabral
Faculdade de Medicina de Petrópolis

Prof. Dr. Márcio Antônio Babinski
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Luiz Augusto Henrique Melki
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2011

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso, pela orientação do trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Augusto Pais Cabral, pelo ensino das técnicas de bioquímica.

Ao doutorando Jorge Luiz Medeiros, pelo auxílio nas técnicas histológicas.

À aluna de Iniciação Científica Arine Peçanha pela confecção das lâminas histológicas.

Ao mestrando Henrique Lima, pelo auxílio na análise histológica.

RESUMO

SOARES, Leila Cristina. *Composição da matriz extracelular do ligamento cardinal de mulheres na pós-menopausa com e sem prolapso uterino*, 2011. 45f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O prolapso uterino tem sua incidência aumentada na pós-menopausa. O objetivo deste estudo é identificar as alterações na matriz extracelular do ligamento cardinal associadas à menopausa e ao prolapso uterino. Ligamento cardinal de três diferentes grupos de mulheres, pré-menopausa, prolapso uterino e pós-menopausa, foram identificados e biopsiados durante 57 histerectomias abdominais ou vaginais. As amostras foram processadas por métodos bioquímicos para caracterização e quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados e colágeno. As concentrações relativas de glicosaminoglicanos foram obtidas por eletroforese. Procedimentos histológicos foram feitos para identificar fibras elásticas (Weigert), distribuição de colágeno (Picro Sirius) e decorin (imunohistoquímica). Nossos resultados mostraram aumento na concentração de GAG de 72,2%, redução na concentração de colágeno de 37% e diminuição de 22% de fibras elásticas no grupo de prolapso uterino quando comparado ao grupo da pós-menopausa ($p < 0,05$, $p < 0,04$ e $p < 0,05$ respectivamente). As concentrações relativas de glicosaminoglicanos sulfatados para condroitin sulfato, heparan sulfato e dermatan sulfato não mostraram diferenças entre os três grupos. A organização do colágeno foi similar entre os três grupos e a marcação do decorin pareceu estar diminuída no grupo de prolapso uterino. Nossos resultados indicam alterações no metabolismo do tecido conjuntivo. O ligamento cardinal da mulher na pós-menopausa possui uma matriz extracelular mais densa. Esta alteração não ocorre na mulher com prolapso uterino.

Palavras-chave: Colágeno. Decorin. Fibras elásticas. Glicosaminoglicanos. Prolapso uterino.

ABSTRACT

Uterine prolapse has increase of incidence after menopause. The aim of this study was to identify the changes in extracellular matrix of cardinal ligaments associated to menopause and uterine prolapse. Cardinal ligament of 3 different groups (pre-menopause, menopause and uterine prolapse) are identified and biopsied during 57 women's abdominal or vaginal hysterectomy. Biopsy specimens were assessed by biochemical methods to characterize and quantify sulfated glycosaminoglycans and collagen. Relative concentrations of GAG were obtained by electrophoresis. Histological procedures are made to identify elastic fibers (Weigert) collagen distribution (Picro sirius) and decorin (immunohistochemistry). Our results showed increase in GAG concentration 72.2% in uterine prolapse group compared to menopause group ($p<0.05$). Collagen concentration was 37% lower in uterine prolapse group compared to menopause group ($p<0.04$). Relative concentration of GAG: heparan sulfate, chondroitin sulfate and dermatan sulfate showed no differences among three groups. Elastic fibers showed a significant reduction of approximately 22% uterine prolapse group compared to menopause group ($p<0.05$). Collagen organization was similar in three groups and the staining pattern of decorin seemed to be decreased in uterine prolapse group. Our results indicate changes in connective tissue metabolism. Cardinal ligament in postmenopausal women has a denser extracellular matrix. This change is not observed in women with uterine prolapse.

Key words: Collagen. Decorin. Elastic fibers. Glycosaminoglycans. Uterine prolapse.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Prolapso genital com eversão completa.....	10
Figura 2 – Esquema de localização do ligamento cardinal.....	16
Figura 3 – Identificação do ligamento cardinal durante histerectomia abdominal.....	17
Figura 4 – Identificação do ligamento cardinal durante a histerectomia vaginal.....	17
Quadro 1– Dados de amostras.....	18
Quadro 2– Estágio de prolapso dos órgãos pélvicos	18
Figura 5 – Fotomicrografias do ligamento cardinal mostrando a distribuição das fibras elásticas. Coloração de Weigert.....	29
Figura 6 – Fotomicrografias do ligamento cardinal mostrando a distribuição das fibras colágenas. Coloração de Picro Sirius.....	30
Figura 7 – Fotomicrografia do ligamento cardinal mostrando, através da marcação por imunohistoquímica, a distribuição de decorin.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média de idade.....	23
Tabela 2 – Média de paridade.....	23
Tabela 3 – Quantificação média de colágeno.....	24
Tabela 4 – Quantificação média de GAG.....	25
Tabela 5 – Comparação entre GAG sulfatados	26
Tabela 6 – Quantificação de fibras elásticas.....	27
Tabela 7 – Picro-sirius – média de scores.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GAG –	Glicosaminoglicanos
MEC –	Matriz extracelular
MMP –	Matriz metaloproteinases

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	10
1	OBJETIVO	15
2	MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1	Aquisição do ligamento cardinal	16
2.2	Preparação do material	19
2.3	Análise da concentração do colágeno	19
2.4	Análise da concentração de GAG	19
2.4.1	<u>Extração e purificação</u>	19
2.4.2	<u>Concentração tissular de GAG totais</u>	20
2.4.3	<u>Análise da composição do GAG</u>	20
2.5	Procedimentos histológicos	20
2.6	Imunohistoquímica	21
2.7	Análise de imagem e avaliação morfológica	22
2.7.1	<u>Picro-sirius</u>	22
2.7.2	<u>Estereologia</u>	22
2.8	Análise estatística	22
3	RESULTADOS	23
3.1	Colágeno	23
3.2	GAG	24
3.3	Fibras elásticas	26
3.4	Matriz conjuntiva	27
3.5	Anti decorin	28
4	DISCUSSÃO	32
5	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39
	ANEXO 1- Comitê de ética em pesquisa	44
	ANEXO 2 – Consentimento informado	45

INTRODUÇÃO

O prolapso uterino (Figura 1) é uma condição comum que afeta a qualidade de vida da mulher particularmente após a menopausa [1]. De todos os fatores de risco para aquisição desta patologia, a paridade mostra a mais forte associação [2].



Figura 1 – Prolapso genital com eversão completa da vagina.

Apesar de o parto cesárea não proteger completamente o assoalho pélvico dos efeitos adversos da gravidez, é universalmente aceito que o parto vaginal tenha um impacto deletério ao desenvolvimento de prolapso de órgãos pélvicos nas mulheres. Na maioria dos casos isto só ocorrerá décadas após o parto, indicando que outros fatores estão envolvidos [3].

Estes fatores podem ser genéticos, obesidade, doenças pulmonares obstrutivas crônicas, desnutrição, atividades físicas associadas com aumento do índice de massa corpórea, tabagismo, constipação e cirurgias pélvicas [4, 5].

A alta incidência de distopias na pós-menopausa sugere que o hipoestrogenismo seja um importante fator causal, já que a perda da função gonadal na mulher produz diversas modificações no trato urogenital. Segundo o *Pelvic Organ Support Study* (POSST), para cada década de vida ocorre um aumento de risco de 10% para aquisição de prolapso uterino [5, 6].

Os órgãos pélvicos são mantidos por interações complexas entre tecidos conjuntivos, músculos e ossos pélvicos que estão sujeitos constantemente a traumas e stress. A estabilidade mecânica do trato urogenital depende de fibras colágenas intactas que suportem a uretra, a bexiga e os órgãos pélvicos [5].

O tecido conjuntivo retroperitoneal tem a função de sustentar as vísceras pélvicas. As condensações ligamentares de tecido conjuntivo estabilizam a vagina em três diferentes níveis descritos por DeLancey. No nível I, os ligamentos uterossacros e cardinais suspendem o colo uterino e terço superior da vagina. No nível II, o terço médio da vagina é mantido na sua posição normal pela inserção lateral da fáschia endopélvica no arco tendíneo da fáschia pélvica. No nível III, ocorre fusão do terço inferior da vagina com o corpo perineal [7].

Enquanto alguns autores fazem distinção entre o ligamento uterossacro e o ligamento cardinal, outros se referem a um complexo cardinal-uterossacro. Lateralmente à sua fusão proximal à cervix e à cúpula vaginal, os dois ligamentos seguem diferentes direções em relação à parede pélvica [8].

O papel dos ligamentos cardinais na manutenção da estática pélvica foi demonstrado de maneira definitiva com os experimentos de Mengert, 1936, nos quais houve comprovação, através da secção dos ligamentos cardinais e uterossacros de cadáveres, de que forneciam o principal suporte uterino de tecido conjuntivo [9].

Em 1996, houve padronização da terminologia dos prolapsos dos órgãos pélvicos femininos. Neste sistema, descrições anatômicas de locais específicos na vagina substituem os termos tradicionais como cistocele, retocele e enterocele. Esta classificação usa seis pontos na vagina (dois no compartimento anterior, médio e posterior) definidos em relação ao hímen e três outras medidas no exame quantitativo que incluem o hiato vaginal, corpo do períneo e o comprimento total da vagina. Após as medidas local-específicas, são designados estágios de acordo com a porção mais baixa do prolapso [10].

A qualidade dos ligamentos depende dos constituintes do tecido conjuntivo, com diferentes combinações de colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos e glicoproteínas

formando a matriz extracelular (MEC). A relação entre as fibras e suas matrizes é importante para determinar as propriedades dos tecidos [11, 12].

As células estão constantemente se remodelando e se adaptando às necessidades de desenvolvimento, sintetizando novos componentes de MEC e degradando os antigos. Dependendo do tipo de órgão há uma considerável diferença na composição da MEC e em sua complacência [13].

O fibroblasto é o maior componente celular do ligamento cardinal, que é formado principalmente de colágeno (70-80%), o que fornece força tênsil a esta estrutura. Os fibroblastos têm importante papel na síntese de colágeno, fibras elásticas e outros componentes da MEC [1, 14].

Dez diferentes tipos de colágeno foram identificados e classificados, mas a relação entre estrutura e ação fisiológica não é totalmente conhecida [15]. A maior parte do peso seco dos ligamentos consiste em colágeno tipo I, mas pequenas quantidades de tipos III, IV e VI também estão presentes. A função de cada ligamento depende de apropriados tipos e metabolismo de seus colágenos [14].

O colágeno tipo I é abundante na pele, nos ligamentos, nos tendões e nos ossos, correspondendo a 80-90% do total de colágenos. O tipo III tem a mesma distribuição do tipo I, com taxas diferentes. Este tipo parece contribuir para uma maior propriedade elástica dos tecidos [15].

O colágeno é degradado por uma família de enzimas conhecidas como matriz metaloproteinases (MMP) [5]. Acredita-se que a MMP seja o principal mediador da degradação da MEC e iniciador do remodelamento dos tecidos. Além disso, esse grupo de enzimas desempenha também um importante papel em processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário, morfogênese, desenvolvimento pós-natal e processos patológicos [16].

Traumas ou patologias podem levar a respostas alteradas no tecido conjuntivo, produzindo modificações na MEC. Alterações na síntese do colágeno e em seus tipos são relatadas em algumas patologias como hérnia inguinal, prolapso genital e incontinência urinária de stress [14].

Os glicosaminoglicanos (GAG) são heteropolissacarídeos com carga iônica negativa possuindo grupamento carboxila e sulfato em sua cadeia. Interação com vários componentes

matriciais e estão envolvidos na regulação da síntese protéica, diferenciação celular, adesão, migração celular e regulação do fluxo de água no tecido conjuntivo [17, 18].

Os principais grupos de GAG são heparan sulfato, queratan sulfato, condroitin sulfato, dermatan sulfato e ácido hialurônico [12].

O ácido hialurônico é essencial na homeostasia da água, motilidade da célula, morfogênese e embriogênese e modulação do processo inflamatório [13].

Existem evidências de que o condroitin sulfato e o dermatan sulfato, que representam a maioria dos GAG dos ligamentos, tenham espectro de atividade similar exercendo importante papel na regulação da cicatrização [19, 20].

Os GAG raramente são encontrados em sua forma isolada, apresentando-se na maioria das vezes na forma de proteoglicanos, unidos a uma cadeia protéica [19].

Os proteoglicanos desempenham um importante papel na integridade da matriz extracelular, interagindo com colágeno e outros componentes. Além disso, suas cargas altamente negativas atraem água reduzindo a fricção das fibras colágenas e aumentando a resistência tecidual. Atribui-se também a eles a regulação das atividades celulares [21].

O decorin é um proteoglicano contendo uma cadeia simples de dermatan sulfato. Diversas observações demonstram a importância do decorin na organização da MEC. Sua deficiência leva a formas irregulares de fibras colágenas e enfraquecimento do tecido conjuntivo [19, 22].

A regulação da fibrilogênese do colágeno por decorin é atribuída as suas propriedades de ligação ao colágeno tipo I. A ligação do decorin regula a cinética da fibrilogênese do colágeno além do diâmetro e da distância entre as fibrilas [23].

Durante o curso da gravidez, o útero sofre modificações importantes. O miométrio exibe grande crescimento e modificações fenotípicas que, acredita-se que sejam moduladas por influências mecânicas e hormonais. Como a gravidez prossegue sob influência de altos níveis de progesterona, a tensão mecânica induz o crescimento e remodelamento miometrial. O estiramento mecânico regula a expressão de componentes da MEC [24].

Aspectos particulares da gravidez diminuirão o risco de trauma que pode ocorrer durante o parto [2].

Poucos estudos investigaram o metabolismo dos proteoglicanos no reparo de ligamentos. Durante o processo de reparo, foram observados aumento de condroitin

sulfato/dermatan sulfato e proteoglicanos. Após dois anos de injúria, o tecido apresenta apenas 50% da força tênsil e postula-se que isso seja devido principalmente a persistência de irregularidades na organização fibrilar do colágeno [25].

As fibras elásticas desempenham um papel crucial na integridade estrutural e na função de diversos órgãos e são formadas por fibrotúbulos envolvendo uma porção central amorfa, constituída pela elastina. No processo de montagem das fibras elásticas, os precursores da elastina (tropoelastina) são depositados em microfibrilas alinhadas de modo ordenado e envoltas pela enzima lysil oxidase para formar a elastina madura [26].

Anormalidades na homeostasia da elastina têm sido implicadas na fisiopatologia do prolapso uterino. Experimentos *in vitro* com fibroblastos do ligamento cardinal indicam que as atividades celulares relacionadas à síntese de elastina estão comprometidas em casos de prolapso uterino [27]. No entanto, não há relatos de quantificação e análise estrutural de fibras elásticas do ligamento cardinal nessa doença.

O mecanismo preciso que leva ao prolapso uterino ainda é pouco conhecido. Anormalidades na estrutura do tecido ou em seus mecanismos de reparo podem ser fatores predisponentes [14]. Variações individuais na qualidade do ligamento e nos constituintes do assoalho pélvico são apontados como essenciais no desenvolvimento desta patologia [28].

1. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é identificar as alterações na MEC do ligamento cardinal associadas à pós-menopausa e ao prolapso uterino.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto em 12 de junho de 2008, conforme resolução nº. 196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos, com o nº. 1731-CEP/HUPE (ANEXO 1).

Foi desenvolvido no laboratório de matriz extracelular da Unidade de Pesquisa Urogenital da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

2.1 Aquisição do ligamento cardinal

Foram obtidas amostras de ligamento cardinal de 57 mulheres submetidas a histerectomia total abdominal ou vaginal (Figuras 2, 3 e 4) por diferentes motivos: leiomioma, massas anexiais, prolapso uterino.

Durante a cirurgia, os ligamentos uterossacos e cardinais foram identificados visualmente e o clampeamento foi feito sob visão direta de cada ligamento. Após a retirada da peça foi realizada uma biópsia de 0,5 cm no ligamento cardinal, bilateralmente à sua inserção cervical.

Para os procedimentos de bioquímica, o ligamento foi fixado em acetona.

Para os procedimentos histológicos, as amostras foram imediatamente fixadas por imersão em formalina 10% preparado em tampão fosfato salino (PBS), em um período de 24 horas.

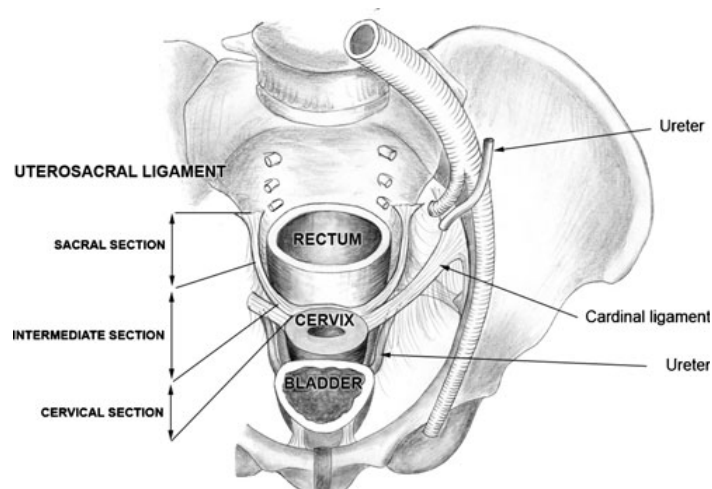


Figura 2 - Esquema de localização do ligamento cardinal (Vu, 2010).

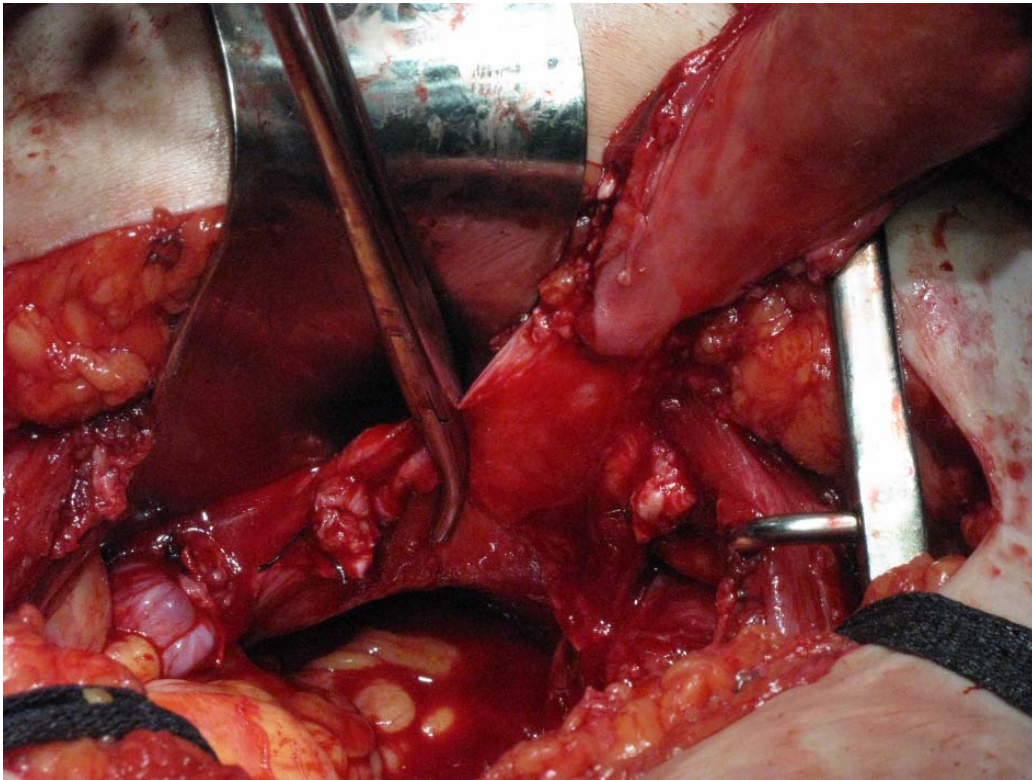


Figura 3 – Identificação do ligamento cardinal durante histerectomia abdominal.

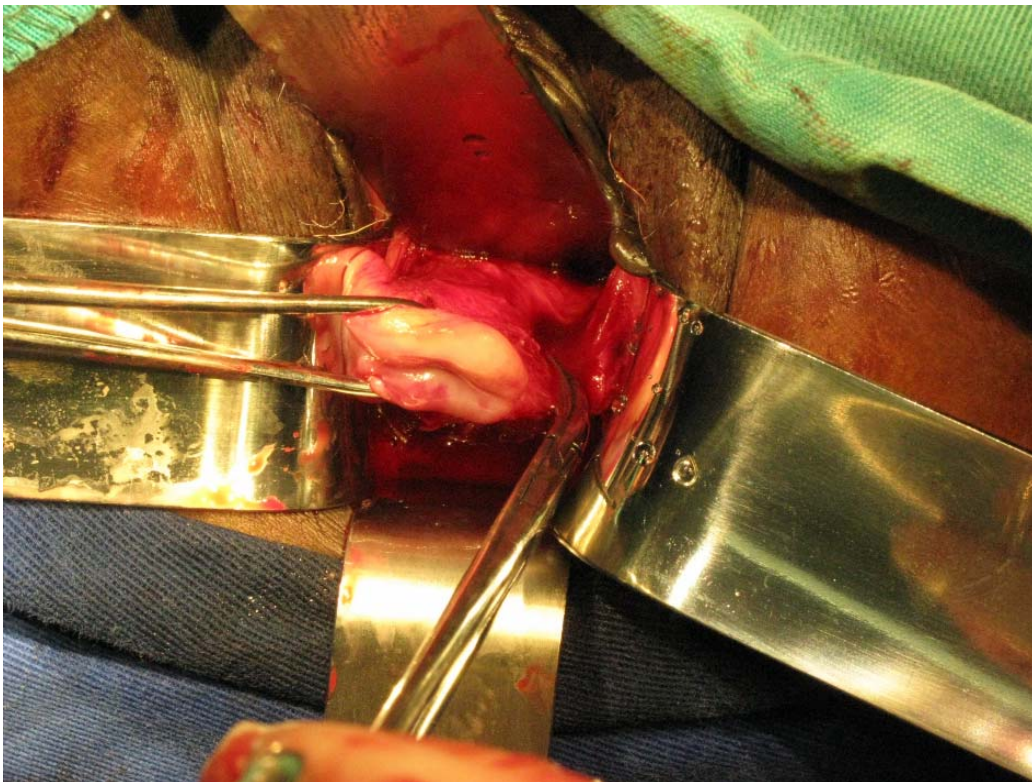


Figura 4 – Identificação do ligamento cardinal durante a histerectomia vaginal.

As amostras foram separadas em diferentes grupos (Quadro1):

- Grupo 1 - Controle: Mulheres na pré-menopausa sem prolapso uterino – 20 amostras, com idades variando entre 33 e 49 anos (média de 44,63 anos). Paridade = 2-6 (média=3,12).
- Grupo 2 - Mulheres na pós-menopausa sem prolapso uterino. Neste grupo foram incluídas apenas mulheres com mais de dois anos de amenorréia – 18 amostras, com idades variando de 50 a 84 anos (média de 62,94 anos). Paridade 2-6 (média=2,76).
- Grupo 3 - Mulheres com prolapso uterino a partir do estágio IV (Tabela 2) – 19 amostras, com idades variando de 55 a 81 anos (média de 69,94 anos). Paridade 2-5 (média=3,46).

Quadro 1 – Dados de amostras: Número de amostras, idade e paridade para cada grupo.

Características	Pré-menopausa	Pós-menopausa	Prolapso uterino
N	20	18	19
Idade (anos)	33-49	50-84	55-81
Paridade	2-6	2-6	2-5

Os critérios de exclusão foram nuliparidade, última menstruação há menos de dois anos (para o grupo de pós-menopausa), uso de terapia de reposição estrogênica, presença de prolapso uterino estágios I, II e III (Quadro 2) e patologias malignas com disseminação para paramétrio.

Quadro 2 – Estágio de prolapso dos órgãos pélvicos – extraído de Bump, 1996.

Estágio 0	Não é demonstrado prolapso.
Estágio I	A parte mais distal do prolapso está a 1 cm acima do nível do hímen.
Estágio II	A parte mais distal do prolapso está a menos de 1 cm proximal ao plano do hímen.
Estágio III	A parte mais distal do prolapso está a mais de 1 cm abaixo do plano do hímen mas não mais de 2 cm a menos que o comprimento total da vagina.
Estágio IV	Eversão completa ou quase completa da vagina

Todas as pacientes que participaram deste estudo assinaram consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2).

2.2 Preparação do material

As amostras foram delipidadas em solução clorofórmio/ metanol (2:1, v/v) por 24 horas, realizando-se dois banhos de delipidação.

O material foi secado em estufa a 60° e realizada a pesagem em balança analítica para obtenção do peso seco total da amostra.

2.3 Análise da concentração do colágeno

A análise da concentração do colágeno total foi determinada pela dosagem do aminoácido hidroxiprolina segundo o método colorimétrico de Bergman e Loxley (1963) [29], onde as amostras de tecido delipidado e seco são submetidas à hidrólise ácida em HCL 6N por 18 horas a 118°. Após neutralização, a dosagem de hidroxiprolina foi realizada e as amostras lidas em espectrofotômetro a 550 nm. O resultado foi expresso em microgramas de hidroxiprolina por miligrama de tecido seco.

2.4 Análise da concentração de GAG

2.4.1 Extração e purificação

As amostras de tecido delipidado e seco foram digeridas com uma protease de amplo espectro (papaína bicristalizada) em tampão acetato 100mM, pH 5, contendo cisteína 5mM e EDTA 5mM, por 24 horas a 60°C. Após centrifugação, cloreto de cetilpiridínio (CPC) foi adicionado ao sobrenadante para precipitar os GAG. As amostras foram centrifugadas e o complexo CPC-GAG no pellet foi dissociado com NaCl 2M. Os GAG foram precipitados ao se adicionar 2 volumes de etanol absoluto às amostras, que foram então mantidas por 24 horas a 4°C. Após uma série de centrifugação e lavagem dos *pellets*, obteve-se a preparação final de GAG total, utilizada nas análises subseqüentes.

2.4.2 Concentração tissular de GAG totais

A quantificação bioquímica de GAG totais foi feita por dosagem de ácido hexurônico. Foi utilizada uma modificação do método do carbazol [30] em que as amostras purificadas de GAG foram inicialmente tratadas com H₂SO₄ a 100°C. A solução de carbazol foi então, adicionada às amostras que foram lidas a 525 nm. A concentração de GAG foi expressa em microgramas de ácido hexurônico por miligrama de tecido seco.

2.4.3 Análise da composição do GAG

A quantidade relativa de GAG sulfatados (condroitin sulfato, dermatan sulfato e heparan sulfato) será determinada por eletroforese) foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,5% (Sigma, St. Louis, EUA) em tampão de 1,3 diaminopropano 50mM, pH 9,0 [31]. A corrida foi feita a 120 V por hora e, em seguida, o gel foi fixado em brometo de trimetilamônio, corado em azul de toluidina 0,1% e a proporção dos GAG sulfatados foi determinada pela densitometria das bandas medidas através de programa Image G, versão 4.0.2 (Scion Corp., Frederick, Maryland).

2.5 **Procedimentos histológicos**

O material foi submetido às técnicas histológicas de rotina, realizando banhos crescentes de etanol para desidratação do tecido, em seguida o espécime foi clarificado com banhos de xilol e embebido em parafina. De cada bloco de parafina foram preparadas 15 lâminas.

Foram feitos cortes histológicos com 5 µm espessura e corados através das técnicas histológicas utilizando as colorações de Hematoxilina & Eosina para verificar a integridade dos tecidos, Resorcina Fucsina de Weigert com prévia oxidação para evidenciar as fibras do sistema elástico e Picro-sirius red para análise da matriz conjuntiva. Ainda cortes da mesma espessura foram dispostos em lâminas silanizadas para as técnicas de imunohistoquímica.

Foram analisadas cinco cortes por paciente com dez campos por corte para a técnica de Weigert e três cortes por paciente com cinco campos por lâmina para Picro-sirius. Para Decorin foram analisadas três cortes por paciente com cinco campos por corte.

2.6 Imunohistoquímica

Para análise do proteoglicano decorin foi utilizada a técnica de imunohistoquímica utilizando o anticorpo *Policlonal Anti-Decorin Goat pAb* 1:100 (Calbiochem cat nº PC673) e anticorpo secundário *Rabbit Anti goat* 1:200 (Zymed 61-1640).

Os cortes foram desparafinados por três banhos sucessivos de xilol de 5 minutos cada, em seguida foram realizados banhos decrescentes de etanol (álcool absoluto, álcool 90%, álcool 80% e álcool 70%) por três minutos cada e, posteriormente, lavados em água destilada por 1 minuto e, em seguida, com tampão fosfato salino (PBS) por 10 minutos. As lâminas foram retiradas do PBS e colocadas no inibidor de peroxidase endógena por 10 minutos. Os cortes foram novamente lavados com três banhos de PBS e posteriormente foi realizado bloqueio para sítios inespecíficos utilizando solução de soro de cabra (*histostastain – Pluss Kits Zymed 2nd generation LAB-SA detection system- reagent A*).

O anticorpo primário (*Policlonal Anti-Decorin Goat pAb*) foi incubado *overnight* a 4°. Em seguida foram feitos três banhos de PBS de 2 minutos cada. Os cortes foram, então, incubados com o anticorpo secundário (*Rabbit Anti goat*) por 20 minutos em temperatura ambiente em câmara úmida. Após lavagem com PBS (três banhos de 2 minutos cada) os cortes foram incubados com *HRP- Streptavidin (histostastain – Pluss Kits Zymed 2nd generation LAB-SA detection system- reagent C)* por 10 minutos e novamente lavados com PBS (três banhos de 2 minutos cada).

Foram realizados controles negativos substituindo o anticorpo primário por PBS e positivos usando fragmentos de tecido (pele) que apresentam os antígenos pesquisados. A revelação foi feita com solução de 3,3, diamino-benzidina tetrahydrocloridro (DAB) (Zymed Laboratórios, numero do catálogo 002014 Carlsbad, CA, E.U.A.) a 0,1% em H₂O₂, lavados em água destilada, desidratado em uma serie crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados com Ethelan.

2.7 Análise de imagem e avaliação morfológica

Todos os cortes de tecido utilizados para microscopia de luz foram fotografados sob as mesmas condições e com uma resolução de 2040 X 1536 pixels, com uma câmera digital (Olympus DP70, Tóquio, Japão) diretamente acoplado ao microscópio (Olympus BX51, Tóquio, Japão).

2.7.1 Picro Sirius

Foram atribuídos *scores* de 1 (predominantemente vermelho/laranja/amarelo), 2 (quantidades aproximadamente iguais de amarelo/ vermelho/ laranja e verde) e 3 (predominantemente verde) aos campos observados e foi calculada a média para cada grupo.

2.7.2 Estereologia

As análises estereológicas foram analisadas em imagens capturadas com objetiva de 600 X para fibras do sistema elástico.

A versão software ImageJ 1,43 (NIH, Bethesda, E.U.A.), carregado com o seu próprio plugin `grid.class` (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/>), foi usado para gerar uma grade contendo 200 pontos, o que foi sobreposto as fotomicrografias digitais. A fração de volume das fibras do sistema elástico foi determinada pela contagem de pontos e expressa por percentagem do espaço de referência.

Foram analisadas cinco lâminas por paciente com 10 campos por lâmina para a técnica de Weigert.

2.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparação dos pares.

3 RESULTADOS

Foram comparados os grupos de menopausa e prolapso uterino para assegurar que teriam médias de idades semelhantes. Para isso, utilizou-se o teste T que evidenciou não haver diferença entre as médias de idade entre os dois grupos (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias de idade.

	Média e desvio-padrão
Pré-menopausa	44,63 ± 3,87
Prolapso uterino	69,94 ± 7,72
Pós-menopausa	62,94 ± 11,17

Teste T entre grupos de pós-menopausa e prolapso uterino não mostrou diferença, revelando tratarem-se de grupos homogêneos quanto à idade.

Também foram comparadas as médias de paridade pelo teste de ANOVA e também não houve diferença entre os três grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias de paridade.

	Média e desvio-padrão
Pré-menopausa	3,12 ± 1,31
Prolapso uterino	3,46 ± 1,26
Pós-menopausa	2,76 ± 1,23

. A análise pelo ANOVA não mostrou diferença entre os três grupos, revelando tratarem-se de grupos homogêneos quanto à paridade.

3.1 Colágeno

A quantificação média de colágeno (Tabela 3) para o grupo de mulheres na pré-menopausa foi de $77,37 \pm 29,18$ μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco. Para o grupo de mulheres na pós-menopausa sem prolapso uterino, a quantificação foi de $104,03 \pm 34,85$ μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco. Para o grupo de prolapso uterino, a quantificação média

foi de $65,52 \pm 23,33$ μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco. Houve diferença entre os três grupos (ANOVA $p < 0,001$).

Nossos resultados mostraram, em relação ao conteúdo de colágeno, que houve aumento de cerca de 34,5% nas mulheres na pós-menopausa sem prolapso uterino em relação às mulheres na pré-menopausa ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os ligamentos das mulheres com prolapso uterino em relação à pré-menopausa. No ligamento das mulheres com prolapso uterino houve redução de cerca de 37% em relação às do mesmo período sem prolapso uterino (grupo da pós-menopausa ($p < 0,05$)).

Tabela 3 – Quantificação média de colágeno.

	Média e desvio-padrão
Pré-menopausa	$77,37 \pm 29,18$
Prolapso uterino	$65,52 \pm 23,33$
Pós-menopausa	$104,03 \pm 34,85^*$

Resultados expressos em μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco. A análise pela ANOVA ($p < 0,05$) e pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$) mostrou diferença significativa entre o grupo de pós-menopausa em relação aos grupos de pré-menopausa e prolapso uterino. O grupo de prolapso uterino apresentou redução de cerca de 37% em relação ao grupo pós-menopausa.

3.2 GAG

A concentração de GAG (Tabela 4) foi, em média de $1,17 \pm 0,44\mu\text{g}$ de ácido hexurônico/ mg de tecido seco para o grupo da pré-menopausa. Para o grupo da pós-menopausa, a concentração de GAG foi, em média, de $0,76 \pm 0,51\mu\text{g}$ de ácido hexurônico/ mg de tecido seco. Para o grupo de prolapso uterino, a concentração de GAG foi, em média, de $1,31 \pm 0,59\mu\text{g}$ de ácido hexurônico/ mg de tecido seco.

Houve diferença entre os três grupos (ANOVA $p < 0,01$), com diminuição de cerca de 35,4% de GAG no grupo da pós-menopausa em relação ao grupo da pré-menopausa ($p < 0,05$). No grupo de prolapso uterino, houve aumento de cerca de 72% do GAG total em relação ao grupo da pós-menopausa ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Quantificação média de GAG.

	Média e desvio-padrão
Pré-menopausa	1,17 ± 0,44
Prolapso uterino	1,31 ± 0,59
Pós-menopausa	0,76 ± 0,51*

Resultados expressos em μg de ácido hexurônico/ mg de tecido seco. A análise pela ANOVA ($p < 0,01$) e pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$) mostrou diferença significativa entre os grupos de pós-menopausa em relação aos grupos de pré-menopausa e prolapso uterino. O grupo de prolapso uterino apresentou concentração 72% maior em relação ao grupo da pós-menopausa.

A análise qualitativa dos GAG não demonstrou diferença entre os 3 grupos tanto para condroitin sulfato ($29,29 \pm 13,67$ % vs. $40,10 \pm 21,90$ % vs. $41,04 \pm 16,93$ %, $p > 0,05$), dermatan sulfato ($62,19 \pm 16,93$ % vs. $51,48 \pm 17,07$ % vs. $48,85 \pm 13,21$ %, $p > 0,05$) e heparan sulfato ($11,7 \pm 5,42$ % vs. $8,26 \pm 4,67$ % vs. $11,28 \pm 6,92$ %, $p > 0,05$), respectivamente para menacme, prolapso uterino e pós-menopausa (Tabela 5).

Como é típico dos ligamentos, houve predomínio do dermatan sulfato em todos os grupos, especialmente nos grupos de pré-menopausa e prolapso uterino.

Tabela 5 – Comparação entre GAG sulfatados.

	CS (média e desvio- padrão)	DS (média e desvio- padrão)	HS (média e desvio- padrão)
Pré- menopausa	29,29 ± 13,67	62,19 ± 16,93	11,7 ± 5,42
Prolapso uterino	40,10 ± 21,90	51,48 ± 17,07	8,26 ± 4,67
Pós- menopausa	41,04 ± 16,93	48,85 ± 13,21	11,28 ± 6,92

Resultados expressos em percentual. A análise pelo ANOVA não demonstrou diferença entre os três grupos (pré-menopausa, prolapso uterino e pós-menopausa) para condroitin sulfato (CS), dermatan sulfato (DS) e heparan sulfato (HS).

3.3 Fibras elásticas

No grupo da pós-menopausa observou-se maior quantidade de fibras elásticas pela coloração de Weigert (Figura 5).

A quantificação entre os três grupos mostrou que a média de fibras elásticas foi de 13,87% para o grupo de pré-menopausa, de 13,94 % para o grupo de prolapso uterino e de 18,08% para o grupo de pós-menopausa ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Nossos resultados mostraram haver uma redução de cerca de 22% de fibras elásticas em no grupo de prolapso uterino em relação ao grupo da pós-menopausa ($p < 0,05$).

Houve aumento de cerca de 30% de fibras elásticas no grupo da pós-menopausa quando comparadas ao grupo de pré-menopausa ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Quantificação das fibras elásticas.

	Média e desvio-padrão
Pré-menopausa	13,87 ± 3,6
Prolapso uterino	13,94 ± 2,43
Pós-menopausa	18,08 ± 2,57*

Resultados expressos em percentual. A análise pela ANOVA ($p < 0,05$) e pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$) mostrou diferença significativa entre os grupos pós-menopausa em relação aos grupos da pré-menopausa e prolapso uterino. Houve redução no grupo prolapso em relação ao grupo pós-menopausa de aproximadamente 22%.

3.4 Matriz conjuntiva

Após atribuição dos scores foi calculada a média para cada grupo. O score 1 indica um colágeno mais organizado e o 3 o colágeno mais degradado (Figura 6).

Para o grupo da pré-menopausa a média foi de $1,39 \pm 0,29$, para o grupo do prolapso uterino a média foi de $1,37 \pm 0,47$ e para o grupo da pós-menopausa a média foi de $1,2 \pm 0,17$. Não houve diferença entre os três grupos (ANOVA, $p > 0,05$). (Tabela 7)

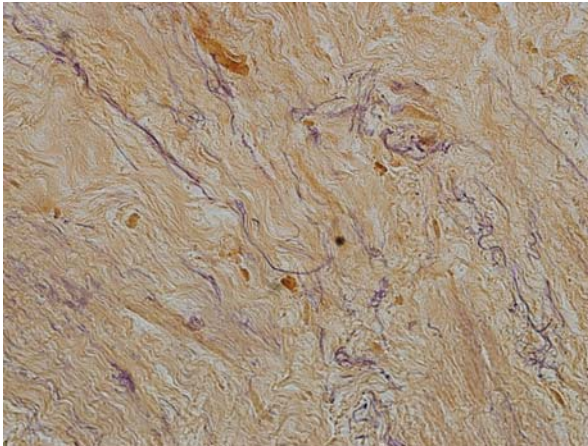
Tabela 7 – Picro Sirius – média de scores.

	Média e desvio-padrão
Pré-menopausa	1,39 ± 0,29
Prolapso uterino	1,37 ± 0,47
Pós-menopausa	1,2 ± 0,17

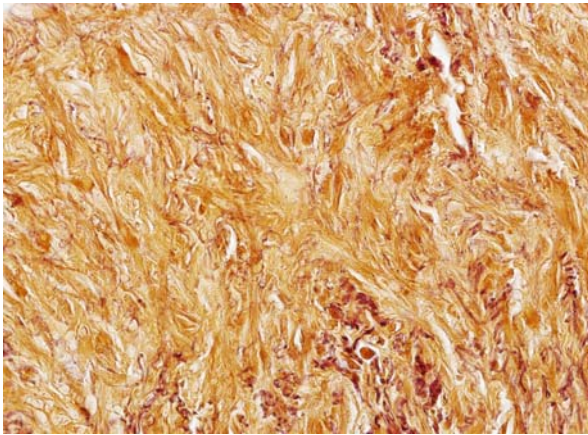
1- vermelho/laranja/ amarelo; 2 – quantidades iguais de amarelo/ vermelho/ laranja e verde e 3 – predominantemente verde – A análise pelo ANOVA não demonstrou diferença entre as médias dos três grupos ($p > 0,05$).

3.5 Anti-decorin

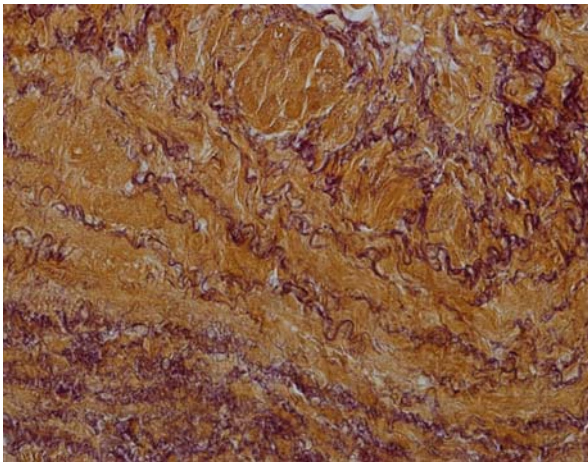
Apesar de não ter havido quantificação, a marcação com anti-decorin evidenciou uma aparente diminuição no grupo de prolapso uterino em relação aos outros grupos (Figura 6).



A



B



C

Figura 5 – Fotomicrografias do ligamento cardinal mostrando a distribuição das fibras elásticas. A - pré-menopausa. B- prolapso uterino. C – pós-menopausa - fibras elásticas coradas em roxo. Observa-se uma maior tortuosidade das fibras no grupo de pós-menopausa. Coloração: Weigert – Aumento: 600x.

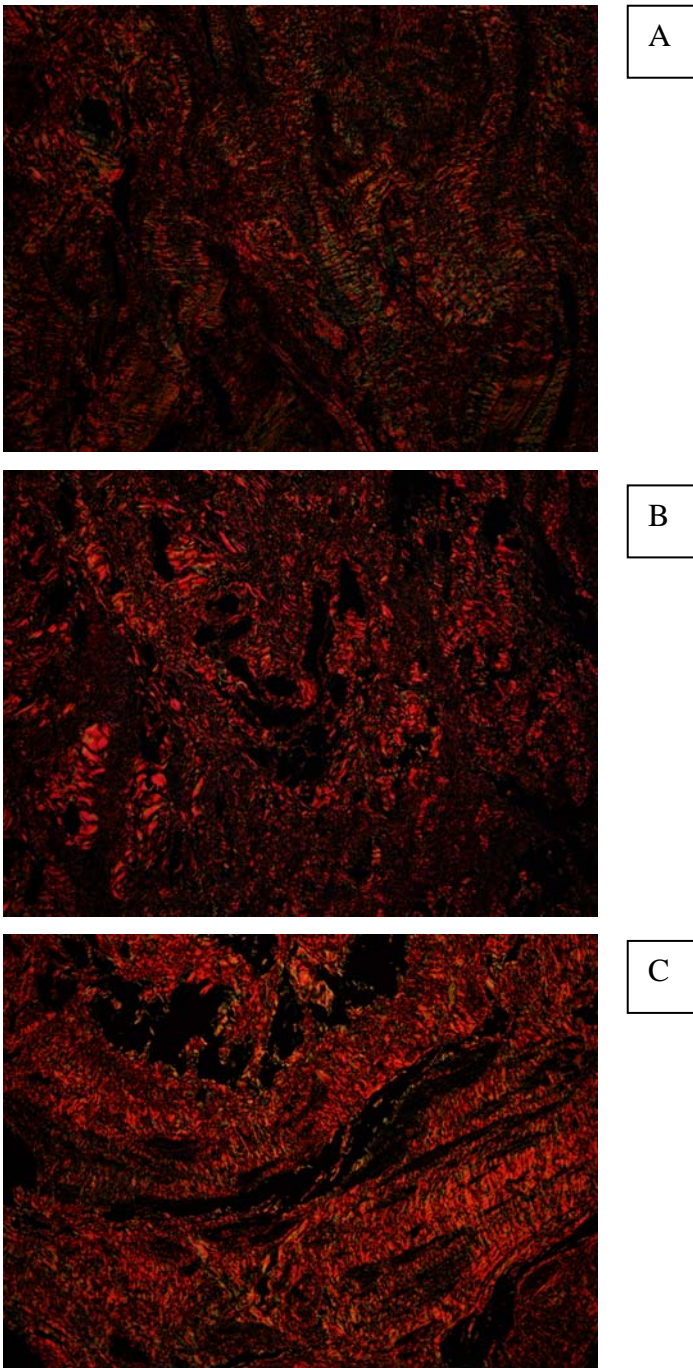


Figura 6 – Fotomicrografias do ligamento cardinal mostrando a distribuição das fibras colágenas. A - pré-menopausa. B- prolapso uterino. C – pós-menopausa. Predomínio da coloração vermelha nos três grupos. Coloração: Picro Sirius red– Aumento: 100x.

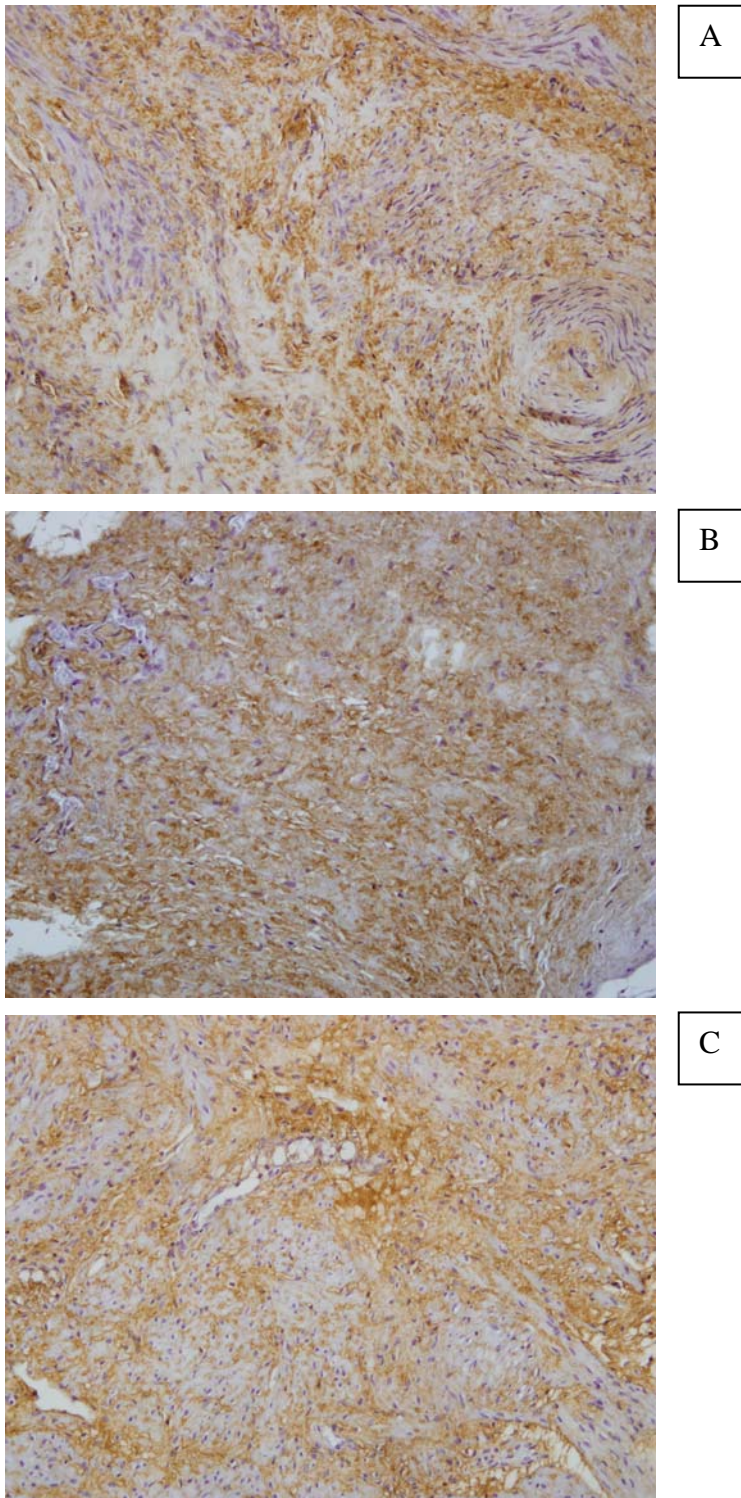


Figura 7 – Fotomicrografia do ligamento cardinal mostrando, através da marcação por imunohistoquímica, a distribuição de decorin– A –menopausa, B- prolapso uterino e C – pós-menopausa. Aumento: 200x. A marcação foi aparentemente menor no grupo do prolapso uterino.

4 DISCUSSÃO

Os principais fatores que determinam o prolapso uterino são a paridade e o hipostrogenismo. Menos de 1% dos casos ocorrem em mulheres nulíparas e um parto aumenta em quatro vezes as chances de ocorrência de prolapso [2].

As modificações impostas pela gravidez levam a alterações na composição da MEC dos tecidos envolvidos, dentre eles, o ligamento cardinal, aumentando sua flexibilidade e reduzindo sua força tênsil. A injúria tecidual associada à gestação e ao parto tem ação direta no metabolismo da MEC no tecido conjuntivo e muscular. Dependendo do stress aplicado ao tecido, os padrões da matriz extracelular podem variar.

Os níveis de expressão de colágeno tipos I e III são correlacionados com mudanças gestacionais nas taxas de estrogênio e progesterona, sugerindo regulação hormonal de ambos os genes. Shynlova et al. [24] demonstraram aumento da expressão de todos os genes da matriz extracelular no miométrio sob a influência de altos níveis de progesterona que ocorrem durante a gravidez, com perfis temporais diferentes para cada componente: diminuição dos colágenos tipos I e III e aumento da laminina, colágeno tipo IV e fibronectina próximo ao termo.

A regeneração efetiva de ligamentos requer não apenas a produção de moléculas da MEC. Essa produção deve ter uma composição apropriada para a regulação de funções que irão resultar no reparo final.

Nosso trabalho mostrou que o ligamento cardinal das mulheres com prolapso genital possuía menor conteúdo de colágeno em relação às mulheres na pós-menopausa, com redução de cerca de 37%.

O conteúdo de colágeno diminuído pode ser explicado pela degradação aumentada nos casos de prolapso uterino, devido à desregulação do seu metabolismo.

A influência do estrogênio no tecido conjuntivo pode ser dependente da regulação do metabolismo do colágeno. O estrogênio não somente estimula a biossíntese fibrilar do colágeno como também aumenta a síntese, secreção e atividade da MMP, que pode degradar numerosos componentes do tecido conjuntivo, incluindo o próprio colágeno [32].

Os baixos níveis de estrogênio da pós-menopausa resultariam então, em um ligamento com maior conteúdo de colágeno, pela menor degradação neste período. Isso ocorreria no

envelhecimento normal, como observado no trabalho de Cox et al. [33], que mostrou diminuição de matriz metaloproteinases (MMP2 e MMP9) no epitélio vaginal em ratas ooforectomizadas. Nos tecidos de suporte de mulheres com prolapso uterino, foi observado menor conteúdo de colágeno quando comparados aos mesmos tecidos de tecidos de mulheres sem a mesma condição. O trabalho de Chen et al. [34] demonstrou que, em parede vaginal de mulheres com prolapso uterino, ocorria aumento da MMP1. Edwall et al. [35] observaram aumento nas concentrações de procolágeno I e principalmente de procolágeno III em mulheres com prolapso uterino, sugerindo um aumento no catabolismo do colágeno nessa condição.

Corroborando estes achados, Takano et al. [28], estudando paramétrio e cúpula vaginal, observaram não haver diferença na composição do colágeno entre mulheres com prolapso uterino na pré e pós-menopausa e que ambas apresentavam apenas redução do conteúdo total de colágeno em relação às mulheres na pós-menopausa sem prolapso uterino.

Na pós-menopausa os níveis de estrogênio diminuem e, com isso, ocorre diminuição na degradação de colágeno. No prolapso uterino esta degradação continuaria a ocorrer e isso poderia ser resultante de um aumento dos receptores de estrogênio presentes no ligamento tornando-o mais sensível aos baixos níveis circulantes de estrogênio. Alguns trabalhos mostraram aumento de receptores de estrogênio em ligamentos em casos de prolapso uterino, porém os resultados são conflitantes. Lang et al. [36] evidenciaram correlação positiva entre receptores de estrogênio de ligamento cardinal de mulheres com prolapso uterino e número de anos de pós-menopausa. Ewies et al. [37] evidenciaram aumento da expressão de receptores de estrogênio α , progesterona e androgênio em ligamento cardinal de mulheres com prolapso uterino. Porém, o trabalho de Bai et al. [39] em ligamento uterossacro demonstrou diminuição dos receptores de estrogênio em mulheres com prolapso uterino.

Os receptores de estrogênio aumentados nos tecidos de prolapso uterino poderiam ser responsáveis pelo maior catabolismo do colágeno nesta patologia, levando a um ligamento com menor firmeza, quando comparado aos de mulheres na pós-menopausa.

Assim como o conteúdo de colágeno, a sua relação I/III parece estar alterada no prolapso uterino.

Gabriel et al. [39] não observaram diferenças na expressão de colágeno tipo I em ligamento uterossacro, porém evidenciaram aumento da expressão de colágeno tipo III na

presença de prolapso uterino, sugerindo que a expressão aumentada deste tipo seja característica típica do tecido conjuntivo de pacientes com prolapso. Este aumento no prolapso uterino também foi evidenciado por Ewies et al. [14] que observaram também, aumento de colágeno tipo I e redução de colágeno tipo III no ligamento cardinal de mulheres na pós-menopausa.

Na avaliação da matriz conjuntiva, nossos resultados não evidenciaram diferenças na organização do colágeno entre os três grupos.

Os danos ao tecido conjuntivo produzem uma série de respostas coordenadas que envolvem infiltração de células inflamatórias e produção de uma matriz extracelular rica em colágeno [25].

Os achados do prolapso uterino são semelhantes ao processo de remodelamento inicial, onde ocorre aumento da produção de colágeno tipo III, formando uma matriz provisória mais frouxa, que será posteriormente substituída por colágeno tipo I [40].

Como o colágeno tipo I é o principal determinante da força tênsil do tecido conjuntivo e o aumento no colágeno tipo III parece diminuir a força mecânica por diminuição do tamanho da fibra [41], o maior conteúdo de colágeno tipo III nos tecidos de sustentação poderia ser um fator determinante para a ocorrência do prolapso uterino.

A degeneração crônica tecidual envolve remodelamento da MEC e aumento da secreção de proteoglicanos que são perpetuados durante a fibrose. A migração de fibroblastos é essencial para o aparecimento de tecido de granulação e a continuação do processo de cura [42].

Nossos resultados em relação ao GAG mostraram haver um aumento significativo de 72% da concentração de GAG em ligamento de mulheres com prolapso uterino em relação ao grupo da pós-menopausa, o que seria explicado pela maior secreção de proteoglicanos durante o processo de reparo após as modificações impostas pela gestação. Este balanço proteolítico positivo em favor do acúmulo de GAG pode ser o responsável pela diminuição de complacência do tecido. Estes resultados foram consistentes com o trabalho de Feldner et al. [19], que demonstraram que mulheres com incontinência urinária e prolapso uterino possuíam maior quantidade de GAG no tecido periuretral.

Existem evidências de alteração da composição da MEC de acordo com o status hormonal. O estrogênio tem papel importante no aumento de GAG nos tecidos.

Cabral et al. [43] observaram redução do conteúdo de GAG na bexiga de ratas ooforectomizadas e de Deus et al. [44], além de observarem esta redução, observaram também redução na proporção de ácido hialurônico, com recuperação para valores semelhantes aos não castrados com a terapia de reposição hormonal.

A ação do estrogênio no metabolismo dos GAG foi bem documentada por Maroclo et al. [45], que observaram padrão bifásico de excreção urinária de GAG no ciclo menstrual normal concluindo que estas variações eram moduladas por ação do estrogênio.

Em relação aos GAG sulfatados, nossos resultados não evidenciaram diferença entre os três grupos, tanto para condroitin sulfato, dermatan sulfato bem como heparan sulfato, porém, como é característico dos ligamentos, o GAG predominante foi o dermatan sulfato.

O trabalho de Feldner et al. [12] demonstrou menor quantidade de GAG sulfatados no tecido periuretral de mulheres na pós-menopausa, assim como nossos resultados no ligamento cardinal, porém com maior quantidade de dermatan e condroitin sulfato em mulheres com prolapso uterino.

O processo de envelhecimento natural leva a modificações da MEC que resultam em um ligamento rico em colágeno e pobre em GAG.

Durante a vida reprodutiva, a relação entre formação e degradação de colágeno permanece estável. Com o envelhecimento, a degradação apresenta-se diminuída. Com isso, a concentração de colágeno aumenta após a menopausa em diversos tecidos e suas fibras aumentam em diâmetro. Esse processo ocorre em associação à diminuição de GAG e dá origem a um tecido aumentado em resistência, porém diminuído em elasticidade.

No prolapso uterino estas modificações não ocorrem. As alterações, neste caso, sugerem um processo de remodelamento incompleto, onde ocorre redução do conteúdo total de colágeno, observada no nosso trabalho, provavelmente por aumento de expressão das MMP. Este colágeno seria principalmente constituído de colágeno tipo III, semelhante ao que ocorre na matriz provisória, contribuindo ainda mais para um tecido com menor tensão. Associado a isso, o aumento de GAG observado no nosso trabalho também é semelhante ao que ocorre no processo inicial de remodelamento e contribuiria para um tecido menos firme.

Ao contrário de outros órgãos adultos, o *turnover* das fibras elásticas parece ser contínuo no trato reprodutivo feminino. O efeito do envelhecimento neste processo não é bem

conhecido. A inabilidade em reparar ou sintetizar novas fibras elásticas pode levar ao prolapso uterino em algumas mulheres [46].

Nossos resultados mostraram haver uma redução significativa de fibras elásticas em mulheres com prolapso uterino em relação às idosas.

Recentes evidências em ratos sugerem que a falta de fibras elásticas no tecido conjuntivo desempenha um importante papel na patogênese do prolapso uterino [3]. Wieslander et al. [47] observaram que a recuperação da parede vaginal após gravidez e parto requer um aumento na síntese de fibras elásticas para compensar a atividade elastolítica do pós-parto.

Klutke et al. [50] demonstraram significante redução de elastina em biópsias de ligamentos uterossacos de mulheres com prolapso uterino. Chen et al. [48] demonstraram que genes envolvidos no metabolismo da elastina eram expressos diferentemente no tecido vaginal de mulheres com IUE. Drewes et al. [46] sugeriram que mutações no gene que codifica a lysil oxidase like 1, cujo substrato é a elastina, provocariam inabilidade em reparar ou sintetizar novas fibras elásticas, o que poderia ocasionar o prolapso uterino.

Apesar de não ter havido quantificação, foi observada uma aparente diminuição na marcação do decorin no grupo do prolapso uterino em relação aos outros dois grupos, o que pode indicar um tecido enfraquecido.

O papel do decorin na organização do colágeno e nas propriedades dos tecidos é bem documentado através de estudos em ratos Knockout (gerados com gene deficiente para decorin). O fenótipo desses ratos se assemelha aos defeitos cutâneos observados na síndrome de Ehlers Danhos, uma desordem de tecido conjuntivo caracterizada por hiperextensibilidade da pele, hipermobilidade cutânea e fragilidade tecidual [49].

O ligamento cardinal de mulheres na pós-menopausa é quantitativamente semelhante ao do grupo de pré-menopausa, entretanto, o prolapso uterino é raro neste período da vida. A ocorrência de prolapso poderia ser explicada tanto por uma alteração qualitativa do colágeno deste ligamento, como também pelo comprometimento da MEC também de outros tecidos de sustentação como fâscias e musculatura do assoalho pélvico, o que não ocorreria no menacme.

Slieker-ten Hove et al. [50] demonstraram que as contrações musculares diminuem com o envelhecimento. Weemhoff et al. [51] demonstraram que o envelhecimento resulta em

redução da força de contração e aumento do diâmetro do hiato genital, o que favoreceria a ocorrência de prolapso em caso de enfraquecimento dos outros elementos de suspensão e contenção do útero. Moalli et al. [52] evidenciaram redução na quantidade de colágeno I no arco tendíneo associada à menopausa. O enrijecimento do ligamento poderia compensar o enfraquecimento do assoalho pélvico e da fásia de contenção. Em caso de ligamentos enfraquecidos, estas alterações poderiam favorecer o aparecimento de prolapso uterino.

O hipoestrogenismo leva a modificações da matriz extracelular que não estão presentes nos ligamentos das mulheres com prolapso uterino. Nossas avaliações mostraram que alterações com o envelhecimento incluem aumento do colágeno e das fibras elásticas e diminuição dos GAG. Porém, não somente as quantidades, mas a organização e a distribuição dos diversos componentes como tipos de colágeno e receptores têm seu papel no desenvolvimento desta patologia.

A etiologia do prolapso uterino é complexa e tem origem multifatorial, não sendo possível explicá-la por análises isoladas. No nosso estudo analisamos unicamente o ligamento cardinal. No suporte dos órgãos pélvicos, estão envolvidas outras estruturas como músculos e fásias. Além disso, a matriz extracelular sintetiza uma enorme variedade de componentes, que agirão em funções específicas. O trauma do parto e a extensão da injúria tecidual decorrente dele podem ser o fator desencadeante do processo que culminará no prolapso uterino.

5 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram alteração no metabolismo do tecido conjuntivo do ligamento cardinal de mulheres com prolapso uterino.

A matriz extracelular do ligamento cardinal das mulheres na pós-menopausa é mais densa, caracterizada por aumento de colágeno, redução de glicosaminoglicanos e aumento de fibras elásticas em relação ao ligamento de mulheres na pré-menopausa. Estas características conferem maior firmeza a este ligamento.

Esta alteração não é observada em ligamento cardinal de mulheres com prolapso uterino, que apresentam quantidades semelhantes às de ligamentos na pré-menopausa, caracterizados por baixas concentrações de colágeno e fibras elásticas e altas concentrações de glicosaminoglicanos, o que torna este ligamento mais resistente ao estiramento.

REFERÊNCIAS

1. Liu YM, Choy KW, Lui WT, Pang MW, Wong YF, Yip SK. 17beta-estradiol suppresses proliferation of fibroblasts derived from cardinal ligaments in patients with or without pelvic organ prolapse. *Hum Reprod.* 2006 Jan;21(1):303-8.
2. Patel DA, Xu X, Thomason AD, Ransom SB, Ivy JS, DeLancey JO. Childbirth and pelvic floor dysfunction: an epidemiologic approach to the assessment of prevention opportunities at delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Jul;195(1):23-8.
3. Rahn DD, Acevedo JF, Word RA. Effect of vaginal distention on elastic fiber synthesis and matrix degradation in the vaginal wall: potential role in the pathogenesis of pelvic organ prolapse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 Oct;295(4):R1351-8.
4. Buchsbaum GM, Duecy EE, Kerr LA, Huang LS, Perevich M, Guzick DS. Pelvic organ prolapse in nulliparous women and their parous sisters. *Obstet Gynecol.* 2006 Dec;108(6):1388-93.
5. Strinic T, Vulic M, Tomic S, Capkun V, Stipic I, Alujevic I. Matrix metalloproteinases-1, -2 expression in uterosacral ligaments from women with pelvic organ prolapse. *Maturitas.* 2009 Oct 20;64(2):132-5.
6. Swift S, Woodman P, O'Boyle A, Kahn M, Valley M, Bland D, et al. Pelvic Organ Support Study (POSST): the distribution, clinical definition, and epidemiologic condition of pelvic organ support defects. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Mar;192(3):795-806.
7. Lefevre R, Davila GW. Functional disorders: rectocele. *Clin Colon Rectal Surg.* 2008 May;21(2):129-37.
8. Vu D, Haylen BT, Tse K, Farnsworth A. Surgical anatomy of the uterosacral ligament. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* Sep;21(9):1123-8. aceito em março 2010.
9. Nguyen JK, Lind LR, Choe JY, McKindsey F, Sinow R, Bhatia NN. Lumbosacral spine and pelvic inlet changes associated with pelvic organ prolapse. *Obstet Gynecol.* 2000 Mar;95(3):332-6.
10. Bump RC, Mattiasson A, Bo K, Brubaker LP, DeLancey JO, Klarskov P, et al. The standardization of terminology of female pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction. *Am J Obstet Gynecol.* 1996 Jul;175(1):10-7.
11. Goepel C, Hefler L, Methfessel HD, Koelbl H. Periurethral connective tissue status of postmenopausal women with genital prolapse with and without stress incontinence. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003 Jul;82(7):659-64.
12. Feldner PC, Jr., Kati LM, Sartori MG, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Nader HB, et al. Sulfated glycosaminoglycans of the periurethral tissue in women with and without stress

- urinary incontinence, according to genital prolapse stage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006 Jun 1;126(2):250-4.
13. Serban MA, Prestwich GD. Modular extracellular matrices: solutions for the puzzle. *Methods.* 2008 May;45(1):93-8.
 14. Ewies AA, Al-Azzawi F, Thompson J. Changes in extracellular matrix proteins in the cardinal ligaments of post-menopausal women with or without prolapse: a computerized immunohistomorphometric analysis. *Hum Reprod.* 2003 Oct;18(10):2189-95.
 15. Liapis A, Bakas P, Pafiti A, Frangos-Plemenos M, Arnoyannaki N, Creatsas G. Changes of collagen type III in female patients with genuine stress incontinence and pelvic floor prolapse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 Jul;97(1):76-9.
 16. Garbacki N, Di Valentin E, Piette J, Cataldo D, Crahay C, Colige A. Matrix metalloproteinase 12 silencing: a therapeutic approach to treat pathological lung tissue remodeling? *Pulm Pharmacol Ther.* 2009 Aug;22(4):267-78.
 17. Morris JE, Potter SW, Gaza-Bulsecu G. Estradiol induces an accumulation of free heparan sulfate glycosaminoglycan chains in uterine epithelium. *Endocrinology.* 1988 Jan;122(1):242-53.
 18. Sunil N, Srinivasan N, Aruldas MM, Govindarajulu P. Impact of oestradiol and progesterone on the glycosaminoglycans and their depolymerizing enzymes of the rat mammary gland. *Acta Physiol Scand.* 2000 Mar;168(3):385-92.
 19. Ruhland C, Schonherr E, Robenek H, Hansen U, Iozzo RV, Bruckner P, et al. The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis. *FEBS J.* 2007 Aug;274(16):4246-55.
 20. Lujan TJ, Underwood CJ, Jacobs NT, Weiss JA. Contribution of glycosaminoglycans to viscoelastic tensile behavior of human ligament. *J Appl Physiol.* 2009 Feb;106(2):423-31.
 21. Samiric T, Parkinson J, Ilic MZ, Cook J, Feller JA, Handley CJ. Changes in the composition of the extracellular matrix in patellar tendinopathy. *Matrix Biol.* 2009 May;28(4):230-6.
 22. Ferdous Z, Wei VM, Iozzo R, Hook M, Grande-Allen KJ. Decorin-transforming growth factor- interaction regulates matrix organization and mechanical characteristics of three-dimensional collagen matrices. *J Biol Chem.* 2007 Dec 7;282(49):35887-98.
 23. Trabucco E, Soderberg M, Cobellis L, Torella M, Bystrom B, Ekman-Ordeberg G, et al. Role of proteoglycans in the organization of periurethral connective tissue in women with stress urinary incontinence. *Maturitas.* 2007 Dec 20;58(4):395-405.
 24. Shynlova O, Mitchell JA, Tsampalieros A, Langille BL, Lye SJ. Progesterone and gravidity differentially regulate expression of extracellular matrix components in the pregnant rat myometrium. *Biol Reprod.* 2004 Apr;70(4):986-92.

25. Plaas AH, Wong-Palms S, Koob T, Hernandez D, Marchuk L, Frank CB. Proteoglycan metabolism during repair of the ruptured medial collateral ligament in skeletally mature rabbits. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Feb 1;374(1):35-41.
26. Hirai M, Ohbayashi T, Horiguchi M, Okawa K, Hagiwara A, Chien KR, et al. Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo. *J Cell Biol*. 2007 Mar 26;176(7):1061-71.
27. Yamamoto M, Akazawa K, Aoyagi M, Yamamoto N, Yamamoto K. Changes in elastin-binding protein in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapsus uteri. *Cell Biol Int*. 2002;26(5):441-9.
28. Takano CC, Girao MJ, Sartori MG, Castro RA, Arruda RM, Simoes MJ, et al. Analysis of collagen in parametrium and vaginal apex of women with and without uterine prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2002 Nov;13(6):342-5; discussion 5.
29. Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Biochem*. 1963 35:1961- 5.
30. Taylor KA, Buchanan-Smith JG. A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Anal Biochem*. 1992 Feb 14;201(1):190-6.
31. Dietrich CP, Dietrich SM. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem*. 1976 Feb;70(2):645-7.
32. Rechberger T, Skorupski P. The controversies regarding the role of estrogens in urogynecology. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45 Suppl 1:S17-21.
33. Cox DA, Helvering LM. Extracellular matrix integrity: a possible mechanism for differential clinical effects among selective estrogen receptor modulators and estrogens? *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Mar 9;247(1-2):53-9.
34. Chen BH, Wen Y, Li H, Polan ML. Collagen metabolism and turnover in women with stress urinary incontinence and pelvic prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2002;13(2):80-7; discussion 7.
35. Edwall L, Carlstrom K, Fianu Jonasson A. Markers of collagen synthesis and degradation in urogenital tissue and serum from women with and without uterovaginal prolapse. *Mol Hum Reprod*. 2008 Mar;14(3):193.
36. Lang JH, Zhu L, Sun ZJ, Chen J. Estrogen levels and estrogen receptors in patients with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *Int J Gynaecol Obstet*. 2003 Jan;80(1):35-9.
37. Ewies AA, Thompson J, Al-Azzawi F. Changes in gonadal steroid receptors in the cardinal ligaments of prolapsed uteri: immunohistomorphometric data. *Hum Reprod*. 2004 Jul;19(7):1622-8.

38. Bai SW, Chung DJ, Yoon JM, Shin JS, Kim SK, Park KH. Roles of estrogen receptor, progesterone receptor, p53 and p21 in pathogenesis of pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2005 Nov-Dec;16(6):492-6.
39. Gabriel B, Denschlag D, Gobel H, Fittkow C, Werner M, Gitsch G, et al. Uterosacral ligament in postmenopausal women with or without pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2005 Nov-Dec;16(6):475-9.
40. Provenzano PP, Alejandro-Osorio AL, Valhmu WB, Jensen KT, Vanderby R, Jr. Intrinsic fibroblast-mediated remodeling of damaged collagenous matrices in vivo. *Matrix Biol.* 2005 Jan;23(8):543-55.
41. Moalli PA, Klingensmith WL, Meyn LA. Increased expression of matrix metalloproteinases in the uterine cervix of postmenopausal women. *J Low Genit Tract Dis.* 2003 Jan;7(1):36-43.
42. Cattaruzza S, Perris R. Proteoglycan control of cell movement during wound healing and cancer spreading. *Matrix Biol.* 2005 Sep;24(6):400-17.
43. Cabral CA, Sampaio FJ, Cardoso LE. Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycan and collagen as a consequence of changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. *J Urol.* 2003 Dec;170(6 Pt 1):2512-6.
44. de Deus JM, Girao MJ, Sartori MG, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Nader HB, et al. Glycosaminoglycan profile in bladder and urethra of castrated rats treated with estrogen, progesterone, and raloxifene. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Dec;189(6):1654-9.
45. Maroclo MV, Pereira SD, Sampaio FJ, Cardoso LE. Urinary glycosaminoglycan excretion during the menstrual cycle in normal young women. *J Urol.* 2005 May;173(5):1789-92.
46. Drewes PG, Yanagisawa H, Starcher B, Hornstra I, Csiszar K, Marinis SI, et al. Pelvic organ prolapse in fibulin-5 knockout mice: pregnancy-induced changes in elastic fiber homeostasis in mouse vagina. *Am J Pathol.* 2007 Feb;170(2):578-89.
47. Wieslander CK, Rahn DD, McIntire DD, Acevedo JF, Drewes PG, Yanagisawa H, et al. Quantification of pelvic organ prolapse in mice: vaginal protease activity precedes increased MOPQ scores in fibulin 5 knockout mice. *Biol Reprod.* 2009 Mar;80(3):407-14.
48. Klutke J, Ji Q, Campeau J, Starcher B, Felix JC, Stanczyk FZ, et al. Decreased endopelvic fascia elastin content in uterine prolapse. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008;87(1):111-5.
49. Chen B, Wen Y, Zhang Z, Guo Y, Warrington JA, Polan ML. Microarray analysis of differentially expressed genes in vaginal tissues from women with stress urinary incontinence compared with asymptomatic women. *Hum Reprod.* 2006 Jan;21(1):22-9.

50. Ameye L, Young MF. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology*. 2002 Sep;12(9):107R-16R.
51. Sliker-ten Hove MC, Pool-Goudzwaard AL, Eijkemans MJ, Steegers-Theunissen RP, Burger CW, Vierhout ME. Pelvic floor muscle function in a general female population in relation with age and parity and the relation between voluntary and involuntary contractions of the pelvic floor musculature. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2009 Dec;20(12):1497-504.
52. Weemhoff M, Shek KL, Dietz HP. Effects of age on levator function and morphometry of the levator hiatus in women with pelvic floor disorders. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2010 Sep;21(9):1137-42.
53. Moalli PA, Talarico LC, Sung VW, Klingensmith WL, Shand SH, Meyn LA, et al. Impact of menopause on collagen subtypes in the arcus tendineous fasciae pelvis. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Mar;190(3):620-7.

ANEXO 1 – Comitê de ética em pesquisa

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



Rio de Janeiro, 12 de junho de 2008

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof^a. Patrícia Maria C. O. Duque
Para: Aut. Leila Cristina Soares
Orient. Prof. Luiz Eduardo M. Cardoso

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1731-CEP/HUPE) "COMPOSIÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS E COLÁGENO NO LIGAMENTO CARDINAL DA MULHER MENOPAUSADA COM E SEM PROLAPSO UTERINO" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof^a. Patrícia Maria C. O. Duque
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2 – Consentimento informado

Unidade de Pesquisa do Sistema Urogenital.

Departamento de Anatomia.

Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ.

CONSENTIMENTO INFORMADO

Prezada senhora,

Como é de seu conhecimento, a senhora vai ser submetida a uma cirurgia de retirada do útero. Durante este tipo de cirurgia se retira parte de um ligamento juntamente com o útero, o ligamento cardinal. Este ligamento é freqüentemente desprezado, isto é, jogado fora. Eventualmente esta parte de ligamento pode ser enviada ao Departamento de Anatomia Patológica, onde é utilizada para estudos de rotina e arquivamento.

Nós estamos realizando um estudo sobre a composição bioquímica do ligamento cardinal, com o objetivo de identificar as alterações na MEC do ligamento cardinal associadas à pós-menopausa e ao prolapso uterino. Sua relevância baseia-se na importância comprovada do ligamento cardinal na estática pélvica. Gostaríamos de solicitar, portanto, que a sra. tenha a gentileza de nos autorizar a estudar o ligamento cardinal que será extraído durante a sua cirurgia.

É importante ressaltar que esta extração de parte do ligamento já é parte rotineira da cirurgia de histerectomia e, portanto, não alterará o resultado operatório.

Eu, _____, declaro estar ciente do que foi exposto acima e autorizo a utilização para fins científicos do fragmento de ligamento cardinal que será extraído durante a cirurgia (histerectomia) a que vou ser submetida.

Rio de Janeiro, / / .

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO PESQUISADOR

Responsável pela pesquisa: Luiz Eduardo Macedo Cardoso

E-mail: luizemcardoso@gmail.com