

VIVIANE ALMEIDA DE ALCÂNTARA LOPES¹

MÔNICA REGINA LOURENÇO LUZ¹

GUILHERME NEGRÃO DE SOUZA¹

JOÃO ANTÃO FERNANDES JÚNIOR²

MANUEL DE JESUS SIMÕES³

LUÍZ CAMANO⁴

EDUARDO DE SOUZA³

Alterações histoquímicas das glicosaminoglicanas na cérvix uterina no final da prenhez da rata albina após ministração local de hialuronidase

Histochemical changes of the glycosaminoglycans in the uterine cervix of pregnant rats after local injection of hyaluronidase

Artigos originais

Palavras-chave

Hialuronidase
Glicosaminoglicanas
Maturidade cervical
Colo uterino
Matriz extracelular

Keywords

Hyaluronidase
Glycosaminoglycans
Cervical ripening
Cervix uteri
Extracellular matrix

Resumo

OBJETIVO: estudar as alterações histoquímicas relacionadas às glicosaminoglicanas da cérvix uterina da rata albina, após ministração local de hialuronidase no final da prenhez. **MÉTODOS:** dez ratas com teste de prenhez positivo foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos, numericamente iguais. O Grupo Controle (Gc) foi constituído pelas ratas que receberam 1 mL de água destilada, dose única, no 18^o dia da prenhez, sob anestesia, ministrado na cérvix uterina. O Grupo Experimental (Gex) constou de ratas que receberam, sob as mesmas condições do Gc, 0,02 mL de hialuronidase, diluído em 0,98 mL de água destilada (total de 1 mL). No 20^o dia de prenhez, as ratas foram novamente anestesiadas e submetidas à dissecação, preparando-se a cérvix uterina para estudo histoquímico com coloração de alcian blue e seus bloqueios (pH=0,5, pH=2,5, metilação e saponificação). **RESULTADOS:** verificou-se na lâmina própria no Gc, reação fortemente positiva (+3) e, no Gex, reação negativa, na coloração de alcian blue no pH=0,5. Em pH=2,5 a coloração também se apresentou fortemente positiva (+4) no Gc e fracamente positiva (+1) no Gex. Após metilação, tanto o Gc quanto o Gex mostraram reação negativa após coloração de alcian blue no pH=2,5. Com a reação de metilação seguida de saponificação e na digestão enzimática em lâmina, a coloração da lâmina própria se mostrou negativa em ambos os grupos. **CONCLUSÕES:** há uma nítida predominância de glicosaminoglicanas sulfatadas no Gc em relação ao Gex e uma tênue quantidade de glicosaminoglicanas carboxiladas identificadas no Gex. As modificações evidenciadas na matriz extracelular sugerem que a hialuronidase injetada localmente na cérvix uterina promoveu alterações bioquímicas compatíveis com maturação cervical.

Abstract

PURPOSE: to study the histochemical changes related to the uterine cervix glycosaminoglycan of the albino female rat, after local ministration of hyaluronidases at the end of pregnancy. **METHODS:** ten female rats with positive pregnancy tests were randomly distributed in two numerically equal groups. The control group (Cg) was built up with rats that received a single dose of 1 mL of distilled water in the uterine cervix, under anesthesia, at the 18th pregnancy day. In the experimental group (Exg), the rats received 0.02 mL of hyaluronidase, diluted in 0.98 mL of distilled water (1 mL as a total), under the same conditions as the Cg. At the 20th pregnancy day, the rats were anesthetized once again and submitted to dissection, and the cervix prepared for histochemical study with alcian blue dye and its blockades (pH=0.5, pH=2.5, methylation and saponification). **RESULTS:** strongly positive reaction in the lamina propria (+3) has been seen in the Cg, and negative reaction in the Exg, with pH=0.5 alcian blue staining. With pH=2.5, staining has also been strongly positive (+4) in the Cg, and weakly positive (+1) in the Exg slide. After methylation, both groups have shown negative reaction, with pH=2.5 alcian blue staining. The lamina propria staining became negative after methylation in both groups, followed by saponification and enzymatic digestion on slide. **CONCLUSIONS:** there is clear predominance of sulphated glycosaminoglycans in the Cg as compared to the Exg and a small amount of identified carboxylated glycosaminoglycans in the Exg. The changes evidenced in the extracellular matrix have suggested that the hyaluronidase injected in the uterine cervix has promoted biochemical changes compatible with cervix maturation.

Correspondência:

Viviane Almeida de Alcântara Lopes
Rua Pedro Pomponazzi, 555, apto. 1.104
CEP 04115-000 – São Paulo/SP – Brasil
Fone: (11) 8333-3443/Fax: (11) 3889-9043
E-mail: vivialcantara@hotmail.com

Recebido

13/2/08

Aceito com modificações

21/7/08

¹ Pós-graduandos do Departamento de Obstetrícia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

² Biomédico do Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo– UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

³ Professor Associado do Departamento de Obstetrícia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Professor Titular do Departamento de Obstetrícia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

Financiamento: Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

Introdução

Os métodos para amadurecimento cervical podem ter ações mecânicas, como as laminárias, método de Krause e dilatadores higroscópicos; químicas, que podem ser representadas pelas prostaglandinas e análogos e, mais recentemente, a hialuronidase, que embora desde a década de 1950, esteja disponível para uso obstétrico em suas primeiras apresentações, tem encontrado novo fôlego de produção científica em meio à literatura internacional, a partir dos anos 1990.

A hialuronidase é uma endoglicosidase que despolimeriza o ácido hialurônico, presente na cérvix uterina, em fragmentos de menor peso molecular. Injetando a hialuronidase em colos de gestantes, observou-se redução no tempo de trabalho de parto em primigrávidas e em múltíparas^{1,2}.

No campo experimental, utilizou-se a aplicação cervical de hialuronidase no termo na prenhez de ratas e observou-se intensa colagenólise com diminuição das fibras colágenas, diferentes graus de destruição dos vasos sanguíneos e aumento do espaço intersticial em comparação com os grupos³. Usando ratas albinas prenhas, aplicando dose proporcional a 20.000 unidades turbidimétricas (UTR) em humanos, houve redução da quantidade de fibras colágenas e aumento do número de eosinófilos no estroma cervical⁴.

Em revisão editada pela base Cochrane⁵, concluiu-se que a injeção cervical de hialuronidase parece ter um efeito benéfico sobre o amadurecimento cervical.

Devem-se fazer algumas considerações sobre o processo de amadurecimento cervical em humanos, que parece ocorrer da mesma forma em ratas. A cérvix, em pacientes não grávidas, é uma estrutura fibrosa na qual ocorrem grandes modificações durante a gestação, tornando-se complacente o bastante para a passagem do feto no trabalho de parto.

Nos primeiros estudos sobre o processo de amadurecimento cervical, observou-se intensa colagenólise durante o amadurecimento e dilatação⁶⁻⁸. Contudo, com a evolução dos estudos nesta área e com as novas técnicas de avaliação dos componentes da matriz extracelular, chegou-se a um consenso de que a colagenólise seria apenas a etapa final na cascata de eventos que ocorre no colo, com intuito de promover as alterações de sua estrutura que permitissem um processo de parturição adequado.

O processo de amadurecimento cervical, provavelmente, se inicia com a diminuição dos receptores de progesterona, e conseqüente redução de sua atividade no segmento inferior do útero⁹. Em seguida, observou-se decréscimo na concentração das glicosaminoglicanas (GAGs) sulfatadas¹⁰, da fibronectina¹¹ e grande incremento nas concentrações de ácido hialurônico^{6,9,10,12,13}, resultando

em aumento da concentração de água na matriz extracelular e em desestabilização do arcabouço extracelular que mantém a disposição espacial das fibras de colágeno. Na etapa seguinte, a diminuição da ação progesterônica e as elevadas concentrações de ácido hialurônico levam à ativação dos fibroblastos e macrófagos, aumentando a produção de interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α)^{9,14-17}.

A IL-1 β e o TNF- α induzem a um aumento da expressão endotelial de moléculas de adesão (*endothelial leukocyte adhesion molecule-1*; *vascular cell adhesion molecule-1*) que podem ser produzidos por neutrófilos, monócitos e linfócitos¹⁸. Enquanto isso a quimiotaxia, a migração e a degranulação dos neutrófilos são provocadas pelas altas concentrações de IL-8 na matriz extracelular^{11,19}. As proteases, liberadas após a degranulação dos neutrófilos encontram fibras colágenas já desestabilizadas e susceptíveis a sua ação proteolítica. Ocorre, neste ponto, uma intensa colagenólise. Tal evento, associado ao grande acúmulo de água, devido ao poder hidrofílico do ácido hialurônico, culmina por desestruturar a matriz extracelular, ultimando o amadurecimento cervical.

Diante do exposto, podemos observar que o ácido hialurônico parece desempenhar um importante papel no processo de maturação cervical. Vimos também que o uso da hialuronidase, uma enzima que despolimeriza o ácido hialurônico, vem ganhando cada vez mais espaço como um dos métodos de amadurecimento artificial do colo^{20,21}. Para podermos compreender melhor este paradoxo, devemos entender como realmente atua a hialuronidase e como se comportam as GAGs, no processo de maturação cervical.

Diante destas dúvidas, sentimo-nos estimulados a desenvolver este estudo, que tem como objetivo estudar as alterações histoquímicas relacionadas às GAGs da cérvix uterina da rata albina, após a ministração local de hialuronidase no final da prenhez.

Métodos

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo, foram utilizadas ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), com idade de 90 dias, virgens, pesando aproximadamente 200 g, da linhagem EPM – Wistar. Dez ratas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos, cada grupo constituído por cinco animais e submetidos à experimentação. Com doses únicas por via intracervical no 18º dia da prenhez, o Gc foi ministrado com 1 mL de água destilada e o Gex foi ministrado com 0,02 mL de hialuronidase (Hyalozima®), diluído em 0,98 mL de água destilada. A dose preconizada na rata foi proporcional à estabelecida para humanos, equivalente a 20.000 UTR².

No 20º dia da prenhez, as ratas foram sacrificadas e após cuidadosa observação dos órgãos pélvicos, e em particular, dos cornos uterinos com os conceptos, procedeu-se à dissecação e retirada da cérvix uterina. As peças foram imediatamente mergulhadas em solução de formol tamponado a 10% para fixação, na qual permaneceram por 24 horas.

Para histoquímica da cérvix uterina da rata, usamos o corante alcian blue, que constitui um dos melhores métodos histoquímicos para a demonstração das GAGs²². As GAGs coram-se em azul pelo alcian blue, sendo que as com radicais carboxilados (como o ácido hialurônico) o fazem somente em pH=2,5, enquanto que os sulfatados são corados em pH=2,5 e 0,5²³. Portanto, na reação em pH=0,5 somente as GAGs sulfatadas se coram em azul, enquanto que na reação em pH=2,5 tanto as GAGs sulfatadas quanto as carboxiladas se coram em azul.

O processo de metilação foi realizado tratando-se as lâminas em álcool metílico, contendo 0,4 mL de ácido clorídrico concentrado para cada mL de ácido metílico, durante três horas, aquecido a 60°C. Em seguida, o preparado foi submetido à coloração de alcian blue, pH=2,5²⁴. A metilação impede a coloração tanto das GAGs sulfatadas quanto das carboxiladas à reação de alcian blue no pH=2,5.

Após a metilação, foi feita a técnica de saponificação, lavando as lâminas em álcool absoluto e apo, com álcool a 80%, em seguida, expondo-as a uma solução de hidróxido de potássio a 1% em álcool 80%. Por fim, o preparado foi exposto novamente, à coloração de alcian blue, pH=2,5²⁴. Nesta reação só são coradas em azul as GAGs carboxiladas, pois as estruturas que apresentam

reações positivas à coloração de alcian blue tornam-se negativas, à mesma coloração, após a metilação, e voltam a ser positivas após a saponificação, quando as reações se devem a radicais carboxilados (como o ácido hialurônico), permanecendo negativos quando se devem a radicais sulfatados²⁴.

Com a finalidade de melhor representar a intensidade das reações histoquímicas, lançamos mão da avaliação subjetiva (+1 a +4) indicando a variação da reação, e o símbolo (-) para a sua negatividade.

Resultados

Observou-se na lâmina própria, reação fortemente positiva (3+) com alcian blue; pH=0,5 no Gc e negativa no Gex, como ilustra a Figura 1.

Na lâmina própria observou-se, coloração fortemente positiva alcian blue em pH=2,5 (+4) no Gc e reação fracamente positiva (1+) no Gex, como ilustra a Figura 2.

Pode-se observar a negatividade da reação de metilação, seguida de reação de alcian blue com pH=2,5, no Gc e Gex, como ilustra a Figura 3.

As reações de metilação e saponificação seguidas da reação de alcian blue com pH=2,5, no Gc e Gex foram negativas como demonstra a Figura 4.

Para se ter uma visão objetiva de conjunto dos resultados, organizou-se a Tabela 1 na qual registramos os resultados da detecção e caracterização das GAGs na cérvix uterina no Gc e Gex.

A intensidade das colorações na reação de alcian blue e de seus bloqueios foi semelhante em todos os indivíduos estudados.

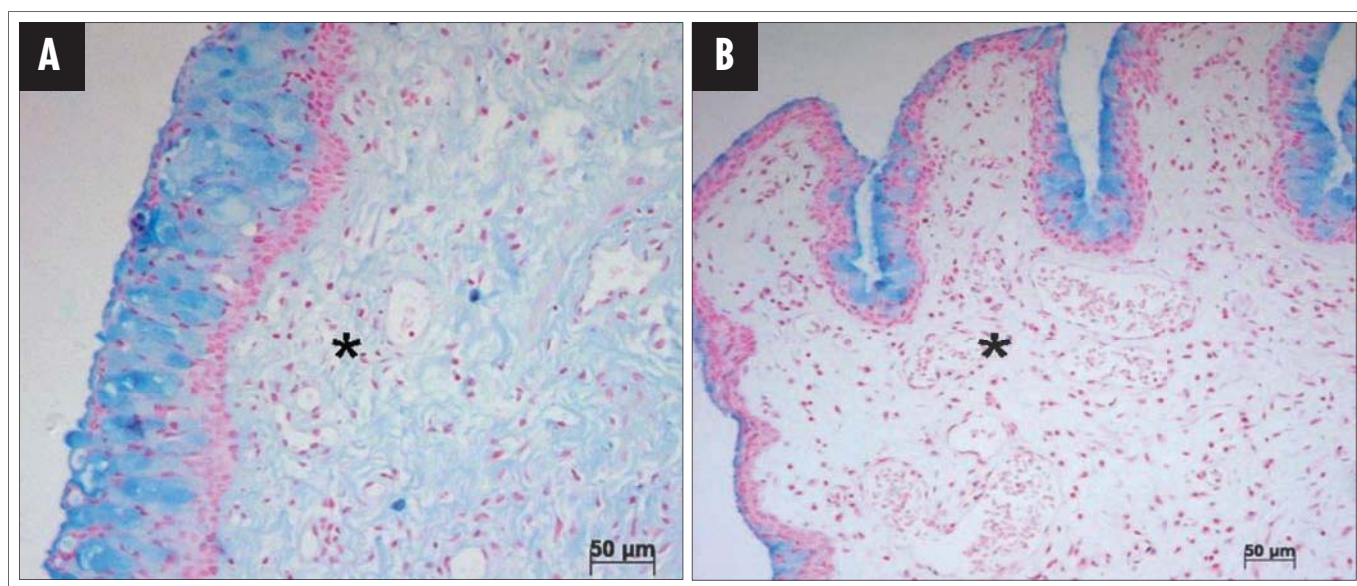


Figura 1 - Coloração na lâmina própria do colo da rata pertencente ao Grupo Controle (A) e ao Grupo Experimental (B), na reação de alcian blue, pH=0,5. Note na lâmina própria (*) a coloração fortemente positiva no Grupo Controle (A) e negativa no Grupo Experimental (B)

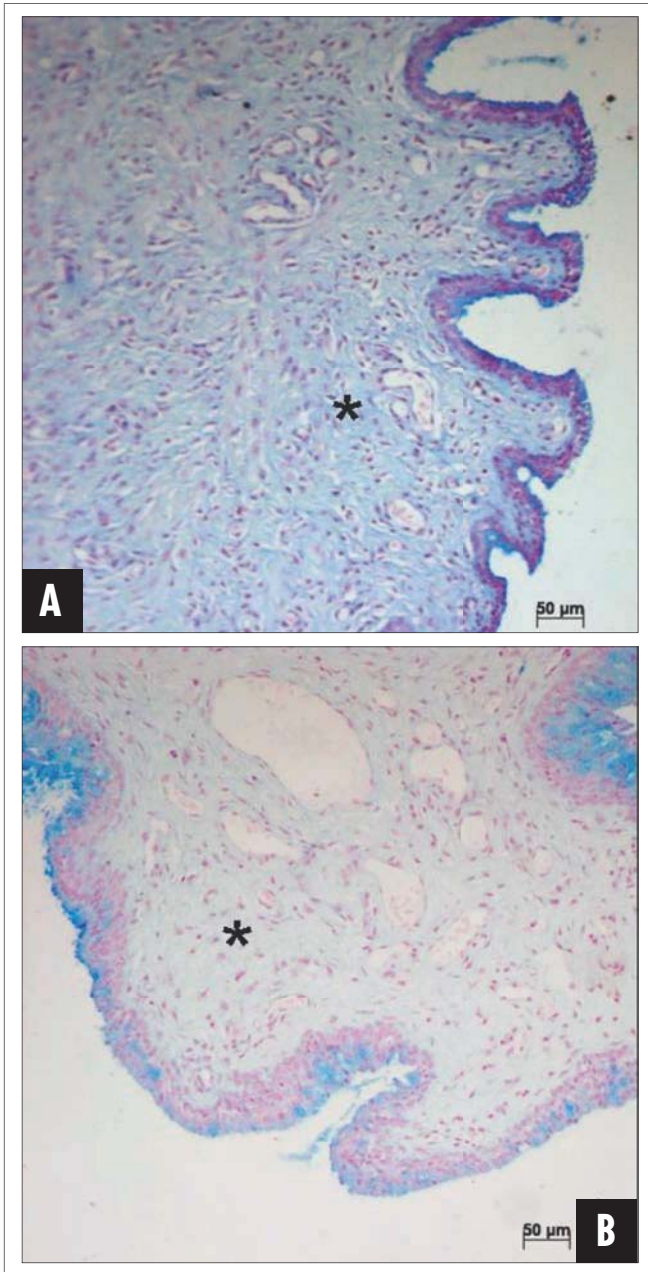


Figura 2 - Coloração na lâmina própria do colo da rata pertencente ao Grupo Controle (A) e ao Grupo Experimental (B), na reação de alcian blue, pH=2,5. Note na lâmina própria (*) a coloração fortemente positiva no Grupo Controle (A) e fracamente positiva no Grupo Experimental (B)

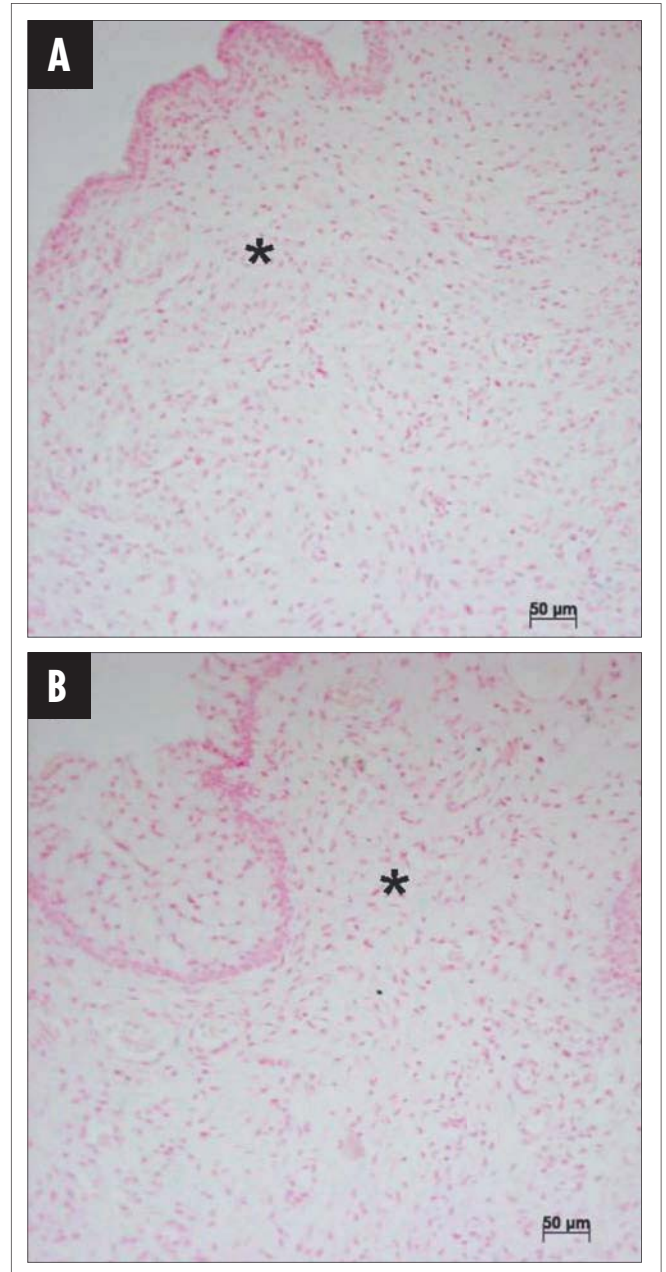


Figura 3 - Coloração na lâmina própria do colo da rata pertencente ao Grupo Controle (A) e ao Grupo Experimental (B), na metilação seguida da reação de alcian blue, pH=2,5. Note na lâmina própria (*) a coloração negativa tanto no Grupo Controle (A) como no Grupo Experimental (B)

Tabela 1 - Reações histoquímicas de alcian blue e seus respectivos bloqueios, na cérvix uterina de ratas no final da prenhez, nos Grupos Experimental e Controle

Grupos	Alcian blue pH=0,5	Alcian blue pH=2,5	Metilação+ Alcian Blue 2,5	Metilação+Saponificação+Alcian blue 2,5
Controle	3+	4+	negativo	negativo
Experimental	(-)	1+	negativo	negativo

Discussão

A matriz extracelular no colo (MEC) imaturo possui alta proporção de GAGs sulfatadas em relação às GAGs carboxiladas, ao contrário do que ocorre em colos

amadurecidos. Esta situação foi bem demonstrada quando se realizou a coloração de alcian blue no pH=0,5 e observou-se uma grande quantidade de GAGs sulfatadas no Gc, na qual não foi injetada hialuronidase, o que caracteriza, portanto, um colo imaturo. Já no Gex, no qual

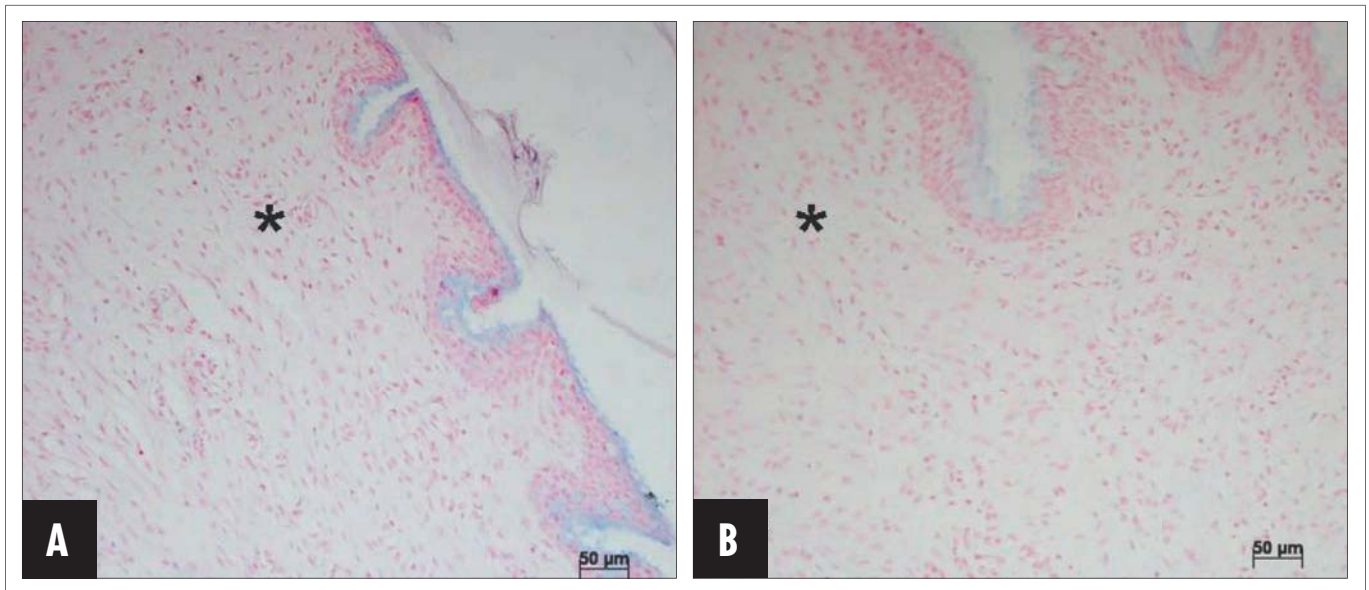


Figura 4 - Coloração na lâmina própria do colo da rato pertencente ao Grupo Controle (A) e ao Grupo Experimental (B), na metilação e saponificação, seguida da reação de alcian blue, pH=2,5. Note na lâmina própria (*) a coloração negativa tanto no Grupo Controle (A) como no Grupo Experimental (B)

houve injeção de hialuronidase, a reação foi negativa. Neste grupo, foi documentada uma baixa concentração de GAGs sulfatadas na MEC, evento que costuma ser observado em colos amadurecidos.

Parece que as altas concentrações de GAGs sulfatadas podem ser uma defesa contra o processo de amadurecimento cervical. Em um trabalho²⁵, foi demonstrado que, em gestantes em trabalho de parto prematuro inibido, os níveis de sulfato de condroitina se apresentavam elevados, em comparação com gestantes no período pré-termo e no termo. Foi observado também que seu uso exógeno inibiu a atividade da hialuronidase endógena no muco endocervical, impedindo a despolimerização do ácido hialurônico, e evitando, portanto, o início da cascata de eventos catabólicos na MEC.

Na coloração de alcian blue no pH=2,5, na qual tanto as GAGs sulfatadas como as carboxiladas são coradas em azul, foi observada, também, coloração fortemente positiva no Gc. Este fato provavelmente se deve às altas concentrações das GAGs sulfatadas em colos uterinos imaturos. Já no Gex, no qual foi administrada hialuronidase, esperava-se uma reação negativa, refletindo a ação da hialuronidase sobre o hialuronato. Contudo, foi observada coloração fracamente positiva. Este achado pode ser explicado, pois a hialuronidase despolimeriza a grande cadeia de ácido hialurônico (que se encontra em alta concentração na MEC de colos uterinos nas gestações a termo) em moléculas de baixo peso molecular de hialuronato. Portanto, não há transformação do ácido hialurônico em outros produtos metabólicos. Sendo assim, no colo amadurecido, também há uma alta concentração de ácido hialurônico, porém de baixo peso molecular²⁶.

Observou-se um importante aumento na concentração de ácido hialurônico e da atividade da hialuronidase endógena e diminuição significativa do peso molecular do ácido hialurônico, no muco endocervical de gestantes, no primeiro estágio do trabalho de parto, em comparação com gestantes no período pré-termo e no termo²⁶.

Atualmente, sabe-se que existem diferentes atividades biológicas do ácido hialurônico, dependendo do seu peso molecular. Foi observado que pequenos fragmentos de ácido hialurônico (denominados de ácido hialurônico de baixo peso molecular ou ácido hialurônico oligossacarídeo) são capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e degradação da MEC²⁷. Outros autores mostraram que estas pequenas moléculas podem ter também efeitos angiogênicos²⁸, enquanto que o ácido hialurônico de alto peso molecular, ao contrário, pode suprimir a atividade angiogênica, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias e collagenases²⁹⁻³².

Dessa forma, podemos compreender o papel fundamental da hialuronidase no amadurecimento cervical, pois ela inicia o processo inflamatório na MEC, quando despolimeriza o ácido hialurônico de alto peso molecular, uma molécula inerte, em ácido hialurônico oligossacarídeo, que desempenha as importantes funções de produzir citocinas e collagenases que são fundamentais para o processo de amadurecimento cervical.

O processo de metilação impede que tanto as GAGs sulfatadas quanto as carboxiladas sejam passíveis de ser coradas pelo alcian blue. A negatividade das reações, no Gc e Gex, era o resultado esperado.

Já a saponificação, realizada após o processo de metilação, tem como objetivo indicar a presença apenas das

GAGs carboxiladas no tecido estudado, pois são apenas estas que se coram pelo alcian blue após a realização destes dois bloqueios.

A negatividade da reação no Gc já era esperada. Como já citado anteriormente, no colo imaturo, a concentração de GAGs carboxiladas é muito baixa, com um grande domínio das GAGs sulfatadas, evento bem documentado na coloração de alcian blue no pH=0,5.

No Gex, a reação também foi negativa. Isto se deve, muito provavelmente, à ação da hialuronidase exógena que foi aplicada neste grupo. O ácido hialurônico oligossacarídeo, produto da despolimerização do ácido hialurônico, que deve estar em grande quantidade nestes colos então amadurecidos, não foi passível de ser demonstrado por esta técnica.

Na realidade, este modelo experimental utilizado não permitiu detectar o aumento das concentrações do ácido hialurônico que ocorre no período peripartal. Foi possível avaliar o que ocorre nos colos imaturos, representados pelo Gc, e nos colos já amadurecidos, ou seja, que já sofreram todos os eventos catabólicos na MEC, representados pelo Gex. Os estudos que documentaram este aumento fisiológico das GAGs carboxiladas, já citados anteriormente, foram estudos observacionais, sem manipulação dos pacientes ou dos animais estudados.

Dentre os achados, alguns parecem especialmente relevantes. O primeiro deles é a quantidade das GAGs sulfatadas, antes em abundância em colos imaturos e que após a injeção de hialuronidase sofrem uma importante diminuição. Este achado demonstram que as GAGs sulfatadas podem realmente possuir um papel protetor contra o amadurecimento cervical e, conseqüentemente, a prematuridade. Acredita-se que pesquisas e experimentações futuras deverão avaliar melhor este importante papel das GAGs sulfatadas na MEC cervical, e responder a alguns questionamentos: A detecção de quantidades baixas de GAGs sulfatadas no muco endocervical pode ser utilizada na prática clínica como indicador de risco de prematuridade?

Qual a quantidade normal destas GAGs no muco endocervical durante a gestação? E ainda: O uso de GAGs sulfatadas exógenas, aplicadas no colo uterino de gestantes em trabalho de parto prematuro, poderia aumentar as taxas de sucesso de inibição?

Um outro fato que merece destaque é a ação principal da hialuronidase de transformar a longa molécula de ácido hialurônico em ácido hialurônico oligossacarídeo. Estas parecem ser as unidades funcionais de maior importância na MEC do colo uterino no período peripartal. Notou-se que as ações biológicas destas moléculas diferem de acordo com seu peso molecular. As ações de indução da produção de citocinas pró-inflamatórias e colagenases, que desempenham papel fundamental na cascata de eventos bioquímicos no processo de amadurecimento cervical, estão relacionadas ao ácido hialurônico de aproximadamente quatro a seis monômeros^{17,26}. Faz-se necessário saber, por meio de pesquisas futuras, qual o real peso molecular dos ácidos hialurônicos oligossacarídeos, durante o período de amadurecimento cervical em humanos. Com esta informação, será possível fazer uso destas moléculas como indutoras de maturação cervical tanto na gestação a termo, quanto na prematuridade, na qual o uso da hialuronidase como método de amadurecimento cervical ainda é incerto, pois a quantidade de ácido hialurônico nesta população ainda é muito pequena.

Conclusões

Com o emprego desta metodologia, analisando as reações histoquímicas de alcian blue e seus bloqueios na cérvix uterina da rata albina, concluiu-se que há uma nítida predominância de GAGs sulfatadas no Gc e uma tênue quantidade de GAGs no colo do útero que foi tratado com hialuronidase.

Este estudo permitiu concluir que as modificações evidenciadas na MEC suportam que a hialuronidase injetada localmente promoveu alterações bioquímicas compatíveis com maturação cervical.

Referências

- Green PS. Intracervical injection of hyaluronidase. Effect on dilatation and length of labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1967;99(3):337-40.
- Spallicci MDB, Chiea MA, Albuquerque PB, Singer JM, Bittar RE, Zugaib M. Ação da hialuronidase na maturação do colo uterino em gestações a termo. *Rev Ginecol Obstet.* 2000;11(2):93-102.
- Li WJ, Li ZL, Ha KW. Effect of hyaluronidase on cervical ripening. *Chin Med J (Engl).* 1994;107(7):552-3.
- de Souza GN, Cordioli E, de Jesus Simões M, de Souza E, Kulay LJ, Camano L. Morphological and morphometric changes in the cervix uteri of the rat at term pregnancy induced by hyaluronidase. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2004;31(3):225-8.
- Kavanagh J, Kelly AJ, Thomas J. Hyaluronidase for cervical priming and induction of labour. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001;(2):CD003097.

6. Rath W, Osmer R, Szeverenyi M, Stuhlsatz HW, Kuhn W. Changes of glycosaminoglycans in cervical connective tissue during pregnancy and parturition. In: Leppert PC, Woessner FJ, editors. *The extracellular matrix of the uterus, cervix and fetal membranes*. Ithaca: Perinatology Press; 1991. p. 105-12.
7. Winkler M, Rath W. Changes in the cervical extracellular matrix during pregnancy and parturition. *J Perinat Med*. 1999;27(1): 45-60.
8. Myers KM, Paskaleva AP, House M, Socrate S. Mechanical and biochemical properties of human cervical tissue. *Acta Biomater*. 2008;4(1):104-16.
9. Stjernholm Y, Sahlin L, Akerberg S, Elinder A, Eriksson HA, Malmström A, et al. Cervical ripening in humans: potential roles of estrogen, progesterone, and insulin-like growth factor-I. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;174(3):1065-71.
10. Osmer R, Rath W, Pflanz MA, Kuhn W, Stuhlsatz HW, Szeverényi M. Glycosaminoglycans in cervical connective tissue during pregnancy and parturition. *Obstet Gynecol*. 1993;81(1):88-92.
11. Osmer RG, Bläser J, Kuhn W, Tschesche H. Interleukine-8 synthesis and the onset of labor. *Obstet Gynecol*. 1995;86(2):223-9.
12. Kobayashi H, Sun GW, Tanaka Y, Kondo T, Terao T. Serum hyaluronic acid levels during pregnancy and labor. *Obstet Gynecol*. 1999;93(4):480-4.
13. Straach KJ, Shelton JM, Richardson JA, Hascall VC, Mahendroo MS. Regulation of hyaluronan expression during cervical ripening. *Glycobiology*. 2005;15(1):55-65.
14. El Maradny E, Kanayama N, Kobayashi H, Hossain B, Khatun S, Liping S, et al. The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. *Hum Reprod*. 1997;12(5):1080-8.
15. Ogawa M, Hirano H, Tsubaki H, Kodama H, Tanaka T. The role of cytokines in cervical ripening: correlations between the concentrations of cytokines and hyaluronic acid in cervical mucus and the induction of hyaluronic acid production by inflammatory cytokines by human cervical fibroblasts. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;179(1):105-10.
16. Winkler M, Fischer DC, Hlubek M, van de Leur E, Haubeck HD, Rath W. Interleukin-1beta and interleukine-8 concentrations in the lower uterine segment during parturition at term. *Obstet Gynecol*. 1998;91(6):945-9.
17. Uchiyama T, Sakuta T, Kanayama T. Regulation of hyaluronan synthases in mouse uterine cervix. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;327(3):927-32.
18. Fries JW, Williams AJ, Atkins RC, Newman W, Lipscomb MF, Collins T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. *Am J Pathol*. 1993;143(3): 725-37.
19. Rampart M, Van Damme J, Zonnekeyn L, Herman AG. Granulocyte chemotactic protein/interleukin-8 induces plasma leakage and neutrophil accumulation in rabbit skin. *Am J Pathol*. 1989;135(1):21-5.
20. Surita FG, Cecatti JG, Parpinelli MA, Krupa F, Pinto E Silva JL. Hyaluronidase versus Foley catheter for cervical ripening in high-risk term and post term pregnancies. *Int J Gynaecol Obstet*. 2005;88(3):258-64.
21. Spallicci MD, Chiea MA, Singer JM, Albuquerque PB, Bittar RE, Zugaib M. Use of hyaluronidase for cervical ripening: a randomized trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007;130(1):46-50.
22. Lison L. *Histochimie et cytochimie animales: principes et méthodes*. 3ème éd. Paris: Gauthier-Villars; 1960.
23. Lev R, Spicer SS. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem*. 1964;12:309.
24. Spicer SS, Lillie RD. Saponification as a means of selectively reversing the methylation blockade of tissue basophilia. *J Histochem Cytochem*. 1959;7(2):123-5.
25. Obara M, Hirano H, Ogawa M, Tsubaki H, Yoshida Y, Miyauchi S, et al. Does chondroitin sulfate defend the human uterine cervix against ripening in the threatened premature labor? *Am J Obstet Gynecol*. 2000;182(2):334-9.
26. Obara M, Hirano H, Ogawa M, Tsubaki H, Hosoya N, Yoshida Y, et al. Changes in molecular weight of hyaluronan and hyaluronidase activity in uterine cervical mucus in cervical ripening. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001;80(6):492-6.
27. Noble PW, McKee CM, Cowman M, Shin HS. Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages. *J Exp Med*. 1996;183(5):2373-8.
28. West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*. 1985;228(4705):1324-6.
29. Feinberg RN, Beebe DC. Hyaluronate in vasculogenesis. *Science*. 1983;220(4602):1177-9.
30. Takahashi K, Goomer RS, Harwood F, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D. The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1beta (IL-1beta), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999;7(2):182-90.
31. Spessotto P, Rossi FM, Degan M, Di Francia R, Perris R, Colombatti A, et al. Hyaluronan-CD44 interaction hampers migration of osteoclast-like cells by down-regulating MMP-9. *J Cell Biol*. 2002;158(6):1133-44.
32. Nakamura K, Yokohama S, Yoneda M, Okamoto S, Tamaki Y, Ito T, et al. High, but not low, molecular weight hyaluronan prevents T-cell-mediated liver injury by reducing proinflammatory cytokines in mice. *J Gastroenterol*. 2004;39(4):346-54.