Ricardo dos Santos Simões

Concentração do ácido hialurônico e dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina no endométrio de pacientes com síndrome dos ovários policísticos em comparação a de mulheres eumenorreicas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Simões, Ricardo dos Santos
Concentração do ácido hialurônico e dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina no endométrio de pacientes com síndrome dos ovários policísticos em comparação à de mulheres eumenorreicas / Ricardo dos Santos Simões. -- São Paulo, 2015.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Edmund Chada Baracat.

Descritores: 1.Síndrome do ovário policístico 2.Endométrio 3.Ácido hialurônico 4.Proteoglicanas 5.Glicosaminoglicanas

USP/FM/DBD-098/15

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Homenagem especial

Ao Prof "*Carl Peter von Dietrich*", *in memoriam*, e à Profa *Helena Bonciani Nader* Titulares do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo, pela acolhida como aluno de iniciação científica em 2000, onde como aluno de graduação fui iniciado na linha de pesquisa dos glicosaminoglicanos e proteoglicanos, seus exemplos de vida Científica nos marcaram profundamente, obrigado por tê-los conhecido.

Agradecimentos especiais

Ao Professor Doutor Edmund Chada Baracat, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicionais que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer, sempre, saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor. Agradeço também a oportunidade que me deu para integrar o seu Grupo de Investigação e reconheço, com gratidão, não só a confiança que em mim depositou, desde o início, mas também, o sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases deste Projeto. Acima de tudo, obrigado por continuar a acompanhar-me nesta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento em Ginecologia. Qualquer palavra de agradecimento longe ficaria da verdade, pois nossa vida acadêmica profissional e cientifica é nele inspirada. O meu muito obrigado.

Aos Professores: Dra Helena Bonciani Nader e Dr José Maria Soares Júnior, os meus sinceros agradecimentos pelas correções e sugestões. Muito obrigado pelo profissionalismo, pela sincera amizade e pela total disponibilidade que sempre revelaram para comigo. O seu apoio foi determinante na elaboração desta Tese. Quero agradecer em especial pelo acompanhamento, apoio e estímulos que recebi em minha vida profissional.

Dedicatória a Família

À Minha Família, aos Meus Pais (Manuel e Graciete), aos Meus Irmãos (Fabiana e André), pelo companheirismo, convivência, estímulo, paz e harmonia eis a verdadeira riqueza que carrego comigo. A ela dedico todo este trabalho.

Em especial a minha esposa (Ligia) um enorme obrigado por acreditar sempre em mim e naquilo que faço. Espero que esta etapa, que agora termino, possa de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me ofereceu.

Desde o início deste Doutorado, tive o privilégio de contar com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas e instituições. Sem aqueles contributos, esta investigação não teria sido possível de ser realizada;

Ao Laboratório de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM 58), em especial do Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel e a Dra. Katia Cândido Carvalho;

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Serafini, Professor do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pela colaboração na coleta das biopsias e pelas sugestões feitas durante a defesa de qualificação;

Ao Prof. Dr. Walter Pinheiro, Diretor do Ambulatório de Ginecologia do Hospital das Clínicas e Chefe do Setor de Histeroscopia da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pelo aprendizado em Histeroscopia;

A Dra. Sylvia Asaka Yamashita Hayashida do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Setor de Ginecologia Endócrina, pela oportunidade de participar do Ambulatório de Síndrome dos Ovários Policísticos;

Ao Prof. Dr. Adelino Moreira de Carvalho, amigo de longa data, Médico, Ex. Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade de Alfenas (UNIFENAS) e Professor de Português, muito obrigado pela correção do vernáculo;

Ao Prof. Dr. Wanderley Marques Bernardo pelos ensinamentos adquiridos em Medicina baseada em evidências;

Ao Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol, Professor Associado da Disciplina de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal de São Paulo, pela leitura, crítica e sugestões;

As Dras. Adriana Aparecida Carbonel, Carla Cristina Maganhin, Fernanda Teixeira Borges, e Regina Célia Teixeira Gomes pelo auxilio nas determinações dos glicosaminoglicanos, das HASs e dos proteoglicanos;

Aos meus colegas do Hospital Universitário em especial ao Prof. Dr. Paulo Francisco Ramos Margarido e Drs. Maurício Paulo Angelo Mieli e Pérsio Yvon Adri Cezarino que nos auxiliaram na Clinica Ginecológica;

A todos os Meus colegas de Pós-graduação, em especial ao Dr. Luiz Fernando Portugal Fuchs um muito obrigado pela amizade, companheirismo e ajuda fatores muito importantes na realização desta Tese e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação;

Expresso também a minha gratidão e solidariedade a Todas as Pacientes que, embora no anonimato, prestaram uma contribuição fundamental para que este estudo fosse possível e para o avanço da investigação científica nesta área do conhecimento;

Por fim, o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas, uma vez que foram muitas e fica impossível lembrar-me de todas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

Conflito de interesse

Este trabalho não apresenta nenhum conflito de interesse.

O desenvolvimento desta pesquisa ocorreu na Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas, no laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - LIM 58 (FMUSP/LIM58) e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp/EPM).

Normalização adotada

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

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

Sumário

	Pág
Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de gráficos e quadros	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	17
2.1 - Geral	17
2.2 - Específicos	18
3. PACIENTES E MÉTODOS	18
3.1 Desenho do estudo	16
3.1.1 Consentimento	18
3.2. Pacientes	18
3.2.1 Critérios de inclusão	19
3.2.2 Critérios de não inclusão	19
3.2.3 Fluxograma do estudo	19
3.2.4 - Coleta do sangue e exames subsidiários	22
3.2.5 - Obtenção das biopsias endometriais	25
3.3 – Métodos	26
3.3.1 - Análise histológica	26

3.3.2 – Extração e determinação dos glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) 27

3.3.2.1 – Eletroforese em gel de agarose 27

3.3.3 – Quantificação do ácido hialurônico 29

3.3.3.1 - Quantificação do ácido hialurônico pelo método fluorométrico ELISA-like 30

3.3.3.2 - Ensaio tipo sanduíche do ácido hialurônico 30

3.4 - Método imunoistoquímico 31

3.4.1 – Imunoistoquímica para determinar a distribuição do ácido hialurônico 31

3.4.2 – Imunoistoquímica para identificação das HASs e dos proteoglicanos ricos em leucina 32

3.4.3 - Análise da Imunoexpressão 33

3.4.4 – “Western Blotting” 33

3.5 - Cálculo do tamanho da amostra 35

3.6 - Método Estatístico 35

4 – RESULTADOS 36

4.1 - Histomorfológicos 36

4.2 - Quantificação dos GAGs 37

4.3 - Quantificação do ácido hialurônico 40

4.4 – Imunoistoquímicos 41

4.5 – “Western Blotting” 44

5 - DISCUSSÃO 48

6 – CONCLUSÕES 56

7 - ANEXOS 57

8 - REFERÊNCIAS 62

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro
µm	Micrômetro
17α-OH P	17alfa-hidroxiprogesterona
AH	Ácido hialurônico
AES	Androgen Excess Society
BSA	Albumina bovina sérica
ºC	Graus Celsius (Unidade de temperatura)
CA	Circunferência abdominal
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD44 ou HCAM	Molécula de adesão celular receptora para o ácido hialurônico
CE	Câncer endometrial
cm	Centímetro
CS	Condroitim sulfato
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidina
DHEA-S	Sulfato de deidroepiandrosterona
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay"
DS	Dermatam sulfato
ESHRE/ASRM	European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine
EP	Epitélio superficial
ER	Receptor de estrogênio
Erk quinase	Quinase regulada por sinais extracelulares
et al.	Expressão latina indicada pela associação brasileira de normas técnicas, sendo uma abreviatura de *et alii*, que significa e outros
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FIV	Fertilização "in vitro"
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
G	Unidade de aceleração
GAG	Glicosaminoglicano
GAGs	Glicosaminoglicanos sulfatados
G-C	Grupo controle
GL	Glândula
GPR	Receptor de estrogênio acoplado a proteína
G-SOP	Grupo síndrome dos ovários policísticos

H.E	Hematoxilina e Eosina
HABP	Sonda biotinilada anti-proteína de ligação do ácido hialurônico
HAS	Enzima de síntese do ácido hialurônico
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HOMA	“Homeostatic model assessment index”
HS	Heparam sulfato
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
K	Unidade que representa 1000
kDa	Kilo Dalton (unidade de massa atômica)
Ki-67	Marcador de proliferação celular
L	Litro
LH	Hormônio Luteinizante
m	Metro - unidade de medida de comprimento
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NF-kB	Fator kapa nuclear de cadeia leve ativador de células B
NICHD	“National Institute of Child Health and Human Disease”
NIH	“National Institute of Health”
P	Ponto de origem
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
PDA	1,3 diaminopropano acetato
PGRMC	Componente de membrana do receptor de progesterona
PGs	Proteoglicanos
pH	Potencial de hidrogênio
PVDF	Membrana de transferência de fluoreto de polivinilidene
QS	Queratam sulfato
RE	Retículo endoplasmático
RHAMM	Molécula receptora de ácido hialurônico nos processos de migração-específica
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SRLPs	Proteoglicanos de cadeia pequena ricos em leucina
T4L	Tetraiodotironina livre
TGF-β	Fator de transformação beta
TNF	Fator de necrose tumoral

TT	Testosterona total
UGDH	UDP-glicose desidrogenase
UGPP	UDP-glicose pirofosforilase
UI	Unidade internacional
USA	“United States of America”
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
V	Volt

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 - Unidades estruturais dos principais glicosaminoglicanos (Sampaio et al., 2006). 7

Figura 2 – Representação esquemática da via de biossíntese do ácido hialurônico e dos proteoglicanos (Adaptado de Vigetti et al., 2014). 10

Figura 3 - Esquema representativo da síntese do ácido hialurônico pelas enzimas sintases do ácido hialurônico (HAS1, HAS2 e HAS3) estimuladas pelo fator de crescimento do fibroblasto (FGF) em humano (Adaptado de Uchiyama et al., 2005). 11

Figura 4 - Esquema mostrando as classes, resíduos de cisteína, localização cromossômica e organização no cromossoma dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (Adaptado de Schaeffer e Iozzo, 2008). 14

Figura 5 - - Fluxograma do estudo 20

Figura 6. Guia ilustrado para mensuração do escore clínico de hirsutismo (Adaptado de Rosenfield, 1986). 21

Figura 7 - Esquema do método fluorométrico (Adaptado de Martins et al., 2003). 29

Figura 8 - Fotomicrografias do endométrio de mulheres na fase proliferativa e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos. 36

Figura 9 - Perfil dos glicosaminoglicanos, em gel de agarose, presentes no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual. 38

Figura 10 - Perfil dos glicosaminoglicanos, em gel de agarose, presentes no endométrio de pacientes com síndrome dos ovários policísticos. 39

Figura 11 – Fotomicrografias de cortes de endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com

síndrome dos ovários policísticos (G-SOP) submetidos a métodos imunoistoquímicos para detecção de ácido hialurônico (AH) e das enzimas HAS1, HAS2 e HAS3. 42

Figura 12 – Fotomicrografias de cortes de endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP), submetidos a métodos imunoistoquímicos para identificação de decorim, biglicam, lumicam e fibromodulina. 43

Figura 13 - Expressão da detecção por *western blotting* da imunomarcação das proteínas HAS1, HAS2 e HAS3 no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP) em gel de policrilamina. 45

Figura 14 - Expressão da detecção por *western blotting* dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (decorim, biglicam, lumicam e fibromodulina) no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP) em gel de policrilamina. 46

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1- Características estruturais dos glicosaminoglicanos (Sampaio et al., 2006). 8

Tabela 2 – Imunoensaios realizados no Laboratório Central do HC-FMUSP e valores de referência para mulheres na idade reprodutiva. 23

Tabela 3 - Características clínicas e ultrassonográficas das mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP). 24

Tabela 4 - Valores hormonais e glicemia séricos obtidos das mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP). 25

Tabela 5 – Características dos anticorpos para realização de imunoistoquímica. 33

Tabela 6 - Características dos anticorpos para realização do *western blotting.* 34

Tabela 7 – Quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP). 40

Tabela 8 – Quantificação do ácido hialurônico no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP). 41

Tabela 9 – Análise semiquantitativa (escores) das enzimas de síntese do ácido hialurônico (HAS1, HAS2 e HAS3) e dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina no estroma endometrial de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP). 44

Tabela 10 – Expressão das sintases e de pequenos proteoglicanos ricos em leucina no estroma endometrial de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP).

Simões RS. *Concentração do ácido hialurônico e dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina no endométrio de pacientes com síndrome dos ovários policísticos em comparação à de mulheres eumenorreicas* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo: 2015.

INTRODUÇÃO: A matriz extracelular no endométrio fornece vasta gama de sinais envolvidos em diferentes processos celulares, tais como morte celular e proliferação. Neste sentido, os glicosaminoglicanos e os proteoglicanos, juntamente com os fatores de crescimento, modulam várias etapas da angiogênese, proliferação celular e remodelação do estroma, o que pode ser importante para o fluxo menstrual regular e a redução dos processos proliferativos. Além disso, são importantes para a adequada interação materno-fetal. OBJETIVO: Avaliar a concentração de ácido hialurônico, das enzimas de biossíntese do ácido hialurônico - hialurônico sintases (HAS1, HAS2 e HAS3) e dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (decorim, biglicam, lumicam e fibromodulina) no endométrio de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (SOP) e de mulheres eumenorreicas. MÉTODOS: Foram analisadas 20 amostras de endométrio, 10 provenientes de pacientes com SOP e 10 de mulheres com ciclos menstruais regulares na fase proliferativa do ciclo, com idade variando entre 20 e 35 anos, atendidas na Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da FMUSP (HC-FMUSP). A determinação do perfil e da concentração do ácido hialurônico foi efetuada por método bioquímico de ensaio fluorimétrico (ELISA-like). A sua localização no tecido endometrial, assim como as dosagens das enzimas sintases (HAS1, HAS2 e HAS3) e dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (decorim, biglicam, lumicam e fibromodulina e), foi feita por imunoistoquímica e "western blotting". Para a análise dos resultados foi utilizado o teste *t* de *student* ($p \leq 0,05$). Os cálculos foram realizados com auxílio do programa SPSS versão13 (SPSS, Chicago, IL). RESUTADOS: Houve maior concentração de ácido hialurônico no endométrio de mulheres eumenorreicas na fase proliferativa do ciclo menstrual do que no das com síndrome dos ovários

policísticos. Com relação às sintases do ácido hialurônico, observou-se maior reatividade de HAS1 e HAS2 e menor reatividade de HAS3 no endométrio de mulheres com SOP em relação às mulheres com ciclos menstruais regulares na fase proliferativa. Quanto aos pequenos proteoglicanos ricos em leucina notou-se maior imunorreatividade de decorim e lumicam no endométrio de pacientes com SOP. CONCLUSÕES: As pacientes com SOP apresentam menor concentração de ácido hialurônico e maior reatividade ao decorim e lumicam em relação às mulheres com ciclos regulares na fase proliferativa. Esses dados sugerem que nas pacientes com SOP, o endométrio seria menos receptivo e teria mecanismos para evitar a proliferação excessiva.

Descritores: Síndrome do ovário policístico, Endométrio, Ácido hialurônico, Proteoglicanos, glicosaminoglicanos.

Simões RS. *Concentration of hyaluronic acid and small leucine-rich proteoglycans in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome in comparison with eumenorrheic women* [Tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”: 2015.

INTRODUCTION: Endometrium extracellular matrix provides wide range of signals at different cellular levels like cell death and proliferation. In this regard, glycosaminoglycans and proteoglycans, along with growth factors, modulate various stages of angiogenesis, cell proliferation and remodeling of the stroma, which can be important for regulating menses and reducing the proliferative processes. Additionally, it is important for proper fetal-maternal interactions. OBJECTIVE: Evaluate hyaluronic acid concentration, the enzymes of hyaluronic acid synthases (HAS1, HAS2 and HAS3) and small leucine-rich proteoglycans (decorin, lumican, fibromodulim and biglycan) in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and eumenorrheic women. METHODS: A total of 20 endometrial samples from 10 patients with PCOS and 10 women with regular menstrual cycles in the proliferative phase, with ages ranging between 20 and 35 years, attended at Gynecology Division of Clinical Hospital of the FMUSP (HC-USP). Profile determination and the concentration of hyaluronic acid were performed by biochemical method of fluorimetric assay (ELISA-like). Its location in the endometrial tissue as well as the dosage of enzymes synthases (HAS1, HAS2 and HAS3) and small leucine-rich proteoglycans (decorin, lumican, fibromodulim and biglycan) was done by immunohistochemistry and western blotting. To analyze the results Student t test was used ($p < 0.05$). The calculations were performed with software SPSS version 13. RESULTS: A higher concentration of hyaluronic acid in eumenorrheic women endometrium in proliferative phase when compared with polycystic ovary syndrome. Regarding hyaluronic acid synthases, there was a higher HAS1 and HAS2 reactivity and lower HAS3 reactivity in the PCOS endometrium compared to women with regular menstrual cycles in the proliferative phase. Decorin and lumican showed higher immunoreactivity in PCOS endometrium. CONCLUSIONS: PCOS patients have a lower

concentration of hyaluronic acid and greater reactivity to decorin and lumican than eumenorrheic women in proliferative phase. These data suggest that in patients with PCOS, the endometrium would be less receptive and have mechanisms to prevent excessive proliferation.

Descriptors: Polycystic Ovary Syndrome, Endometrium, Hyaluronic Acid, Proteoglycans, Glycosaminoglycans.

1. Introdução

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) constitui uma desordem endócrina que atinge 5-10% das mulheres durante a vida reprodutiva**.** Pode levar a alterações do ciclo menstrual, como amenorreia e oligomenorreia (Azziz et al., 2004, 2005; Shang et al., 2012; Barry et al., 2014; Tokmak et al., 2014; Baracat et al., 2015). Foi descrita pela primeira vez por Stein e Leventhal, em 1935. No entanto, o relato da presença de ovários policísticos em mulheres remonta a pelo menos um século atrás (Azziz et al., 2009).

Esta síndrome tem sido considerada, até hoje, como uma das entidades mais controversas em endocrinologia ginecológica, pois, inclui amplo espectro de sintomas e sinais clínicos que podem também ser associados a outras afecções. Por esta razão, vários debates e consensos foram realizados para estabelecer seus critérios diagnósticos (Azziz et al., 2006).

Três diferentes classificações foram propostas para sua caracterização. A primeira surgiu a partir de uma conferência de peritos, patrocinada pelo *National Institute of Child Health and Human Disease* (NICHD), do *National Institute of Health* (NIH), publicada em 1990, conhecida como "Os critérios do NIH", que exige a presença concomitante de hiperandrogenismo e disfunção menstrual para se diagnosticar a síndrome (Huang et al., 2010). Posteriormente, em 2003, outro painel de especialistas reuniu-se em Rotterdam e adicionou-se, aos critérios anteriores, a presença de múltiplos microcistos nos ovários à ultrassonografia transvaginal (Rotterdam ESHRE/ASRM-*Sponsored* PCOS *Consensus Workshop Group*, 2004). Logo depois, em 2006, a *Androgen Excess Society* (AES) divulgou novos critérios propondo que o hiperandrogenismo clínico e/ou laboratorial seja condição indispensável ao diagnóstico, associado a disfunção menstrual e/ou presença de múltiplos microcistos nos ovários à ultrassonografia transvaginal, após a

exclusão das outras causas conhecidas para hiperandrogenismo (Azziz et al., 2006).

Baseados nos critérios ESHRE/ASRM (2003) e da AE-PCOS *Society* (Azziz et al., 2009), podem ser identificados quatro fenótipos dessa doença: tipo I – hiperandrogenismo, anovulação crônica e ovários policísticos; tipo II - hiperandrogenismo, anovulação crônica e ovários normais; tipo III - hiperandrogenismo, ciclos ovulatórios e ovários policísticos, e tipo IV – sem hiperandrogenismo, mas com anovulação crônica e ovários policísticos.

Existem até hoje dificuldades em se avaliar esta afecção. Talvez a interação entre fatores ambientais e genéticos possa explicar a diversidade de fenótipos. Prapas et al. (2009), em extensa revisão da literatura, referem haver inúmeros fatores genéticos envolvidos nesta complexa síndrome. Encontraram alterações em genes relacionados a várias vias de transdução de sinal: esteroidogênese, ação dos hormônios esteroides, ação e regulação das gonadotrofinas, ação e secreção da insulina, homeostase e inflamação crônica. Esses dados mostram ser a SOP uma doença multicomplexa, com diferentes variantes clínicas (Batista et al., 2012).

A SOP, em sua forma clássica, com a associação de obesidade, anovulação crônica (espaniomenorreia e amenorreia) e hiperandrogenismo, representa a causa mais frequente de infertilidade anovulatória (Qiao et al., 2008; Tamimi et al., 2009; Zabuliene e Tutkuviene, 2010). Pode estar associada a alteração metabólica complexa e, consequentemente, as pacientes teriam alto risco de desenvolver *diabetes mellitus* tipo 2 e carcinoma endometrial (Glueck et al., 2001; Wang et al., 2001; Giudice, 2006; Fornes et al., 2010; Barry et al., 2014; Tokmak et al., 2014).

Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos com o propósito de mimetizar a síndrome. Assinalam-se, entre eles, a administração de hormônios sexuais a ratas (Silva et al., 2002), iluminação contínua (Sing, 2005; Lombardi et al., 2012; 2014), lesões hipotalâmicas (Sing, 2005) e pinealectomia (Prata Lima et al., 2004; Maganhin et al., 2013). Assim, vários mecanismos podem levar a anovulação crônica, com subsequente diminuição da fertilidade, aumento dos androgênios circulantes e redução da produção de progesterona.

Estes modelos tentam responder questionamentos sobre a fisiopatogênese da anovulação e suas repercussões, como alterações endometriais que podem ser responsáveis pela disfunção menstrual e infertilidade em mulheres com SOP (Chittenden et al., 2009; Kohan et al., 2010; Banu et al., 2014).

Além da disfunção ovariana, pode também haver aumento da taxa de abortamento, o que acentua a infertilidade nesse grupo de mulheres (Okon et al., 1998; Franks et al., 2008; Banu et al., 2014). A ocorrência de ovulação espontânea em mulheres com SOP não necessariamente se relaciona a melhor receptividade endometrial e a melhor resultado reprodutivo (Qiao et al, 2008, Lopes et al, 2014). Por outro lado, o tratamento da infertilidade com agentes indutores da ovulação, como o citrato de clomifeno, tem resultados desapontadores em relação à taxa de gravidez (Barbieri, 2000; Ehrmann e Rychlik, 2003; Vause et al., 2010). Este fato é talvez melhor ilustrado na fertilização *in vitro* (FIV), quando também as taxas de sucesso encontradas continuam baixas, apesar da boa qualidade dos embriões transferidos (Li et al., 2014; Pan et al., 2015).

Os dados existentes na literatura não são muito claros sobre os mecanismos da disfunção endometrial na SOP. Acredita-se que não é apenas decorrente da redução da ação da progesterona, como também de vários fatores de crescimento e de citocinas do sistema imunológico (Donaghay e Lessey, 2007; Simões et al., 2013). Estudo de microarranjos analisando o endométrio de pacientes com essa síndrome mostrou haver diminuição da expressão de genes relacionados à codificação de proteínas associadas à constituição do citoesqueleto, à membrana celular, às moléculas de adesão e crescimento (Qiao et al., 2008).

Além disso, o endométrio de mulheres com SOP é mais propenso a desenvolver doenças proliferativas (França Neto et al., 2010). A primeira referência à possível associação de SOP e câncer de endométrio foi publicada em 1949, ou seja, 14 anos após a descrição clássica da síndrome feita por Stein e Leventhal (1935). Considera-se, atualmente, a SOP um fator de risco para o desenvolvimento do câncer do endométrio do tipo I (Papaioannou e Tzafettas, 2010).

Barry et al. (2014) foram os primeiros a realizar estudo de metanálise para correlacionar cânceres ginecológicos em mulheres com SOP, com idade inferior a 54 anos, em comparação a controles da mesma idade. Os dados obtidos sugerem que as mulheres com SOP apresentam risco aumentado de desenvolver câncer de endométrio, mas com relação aos cânceres de ovário e mama não verificaram correlação significante.

Há, na literatura, algumas teorias para explicar as anormalidades endometriais na SOP, visto que os níveis e os receptores de estrogênio e de progesterona acham-se, respectivamente, aumentados e diminuídos. Deve-se salientar que esses esteroides desempenham importante papel no preparo do endométrio para a implantação, ao controlarem a proliferação e a diferenciação celular. Portanto, o desequilíbrio na ação nos receptores pode resultar na quebra da homeostase tecidual endometrial, ocasionando disfunção menstrual e infertilidade (Chakraborty et al., 2005).

Evidências recentes indicam haver baixa sensibilidade da mucosa uterina à ação da progesterona, o que poderia ser a causa da infertilidade (Young e Lessey, 2010; Lessy e Young, 2014). A corroborar com esses dados, observou-se também expressão exacerbada dos genes dos receptores de androgênios e expressão diminuída dos receptores de progesterona não genômicos (PGRMC1) no endométrio de mulheres com SOP (Jayakrishnan et al., 2010; Schuster et al., 2010). Contudo, ainda não é clara a influência do não balanceamento hormonal na matriz extracelular e, principalmente nos níveis de glicosaminoglicanos, que são importantes para a integridade da mucosa, para manter a homeostase tecidual e também na implantação do embrião (Kuznetsova et al., 2002).

Baracat et al. (2015), em revisão sistemática referem ser a síndrome dos ovários policísticos um distúrbio complexo incluindo não apenas o sistema reprodutor, bem como o sistema endócrino e suas repercussões metabólicas. As mulheres são inférteis, não só pela anovulação, mas também pelas alterações endometriais ligadas a mediadores moleculares, como moléculas de adesão celular, citocinas e fatores de crescimento. Estes sugeriram serem necessários mais estudos para compreender melhor a influência desses

mediadores na receptividade endometrial e, consequentemente, no desempenho reprodutivo.

Os glicosaminoglicanos são carboidratos complexos com estrutura dissacarídica básica e repetitiva, formados, em geral, por um monossacarídeo (glucosamina ou galactosamina) que, na maioria das vezes, é N-acetilado, e por um ácido urônico (glucurônico ou idurônico). A presença dos grupamentos carboxílicos no resíduo de ácido urônico e de quantidade variável de grupos sulfato por dissacarídeo leva essas substâncias a apresentar alta densidade de cargas negativas. Estas cargas garantem a essas moléculas grande parte de suas características funcionais por se associarem a cátions livres e, com isso, reterem água nos tecidos. Além disso, permitem também a interação iônica com diversos componentes tais como proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento (Dietrich, 1984; Esko, 1991; Iozzo, 1998; Lopes et al., 2006).

Os principais glicosaminoglicanos ácidos encontrados no endométrio são: condroitim 4 e 6 sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS), queratam sulfato (QS) e o ácido hialurônico ou hialuronam (AH). Verificou-se ser o CS o principal tipo de GAG sulfatado, seguido por HS e DS, presentes nas fases proliferativa e secretora do ciclo endometrial humano (Nasciutti et al., 2006; Yasuo et al., 2010). Estes compostos diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e de açúcar não aminado, quanto ao grau e a posição da sulfatação, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter e intra-dissacarídica.

As unidades estruturais dos diferentes glicosaminoglicanos estão apresentadas na Figura 1 e na Tabela 1. Essas são as unidades mais frequentemente encontradas. Entretanto, ocorrem variações no grau de sulfatação, nas proporções dos tipos de dissacarídeos constituintes e no tamanho molecular.

Com exceção do AH, todos os glicosaminoglicanos nos tecidos encontram-se ligados a uma cadeia proteica, formando os proteoglicanos (Kimura et al., 2000). O AH é constituído por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido D-glucurônico (GlcUA) e N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas β (1-3) e β (1-4) intra e inter-dissacarídica,

respectivamente. Sua densidade de carga negativa é conferida apenas pelos grupamentos carboxílicos, uma vez que, diferentemente dos outros glicosaminoglicanos, não apresenta sulfatação.

A alta complexidade dos proteoglicanos é demonstrada pelas diferenças que apresentam em suas estruturas, como tipo e número de cadeias de glicosaminoglicanos, além do tamanho e natureza da cadeia proteica (Gallagher, 1989). Estas diferenças contribuem para a sua distribuição e função no organismo. A classificação que normalmente é utilizada baseia-se na homologia do esqueleto proteico e na localização celular do proteoglicano, que pode ser subdividido em três grandes grupos: proteoglicanos de matriz extracelular, proteoglicanos de superfície celular e proteoglicanos intracelulares ou de grânulos.

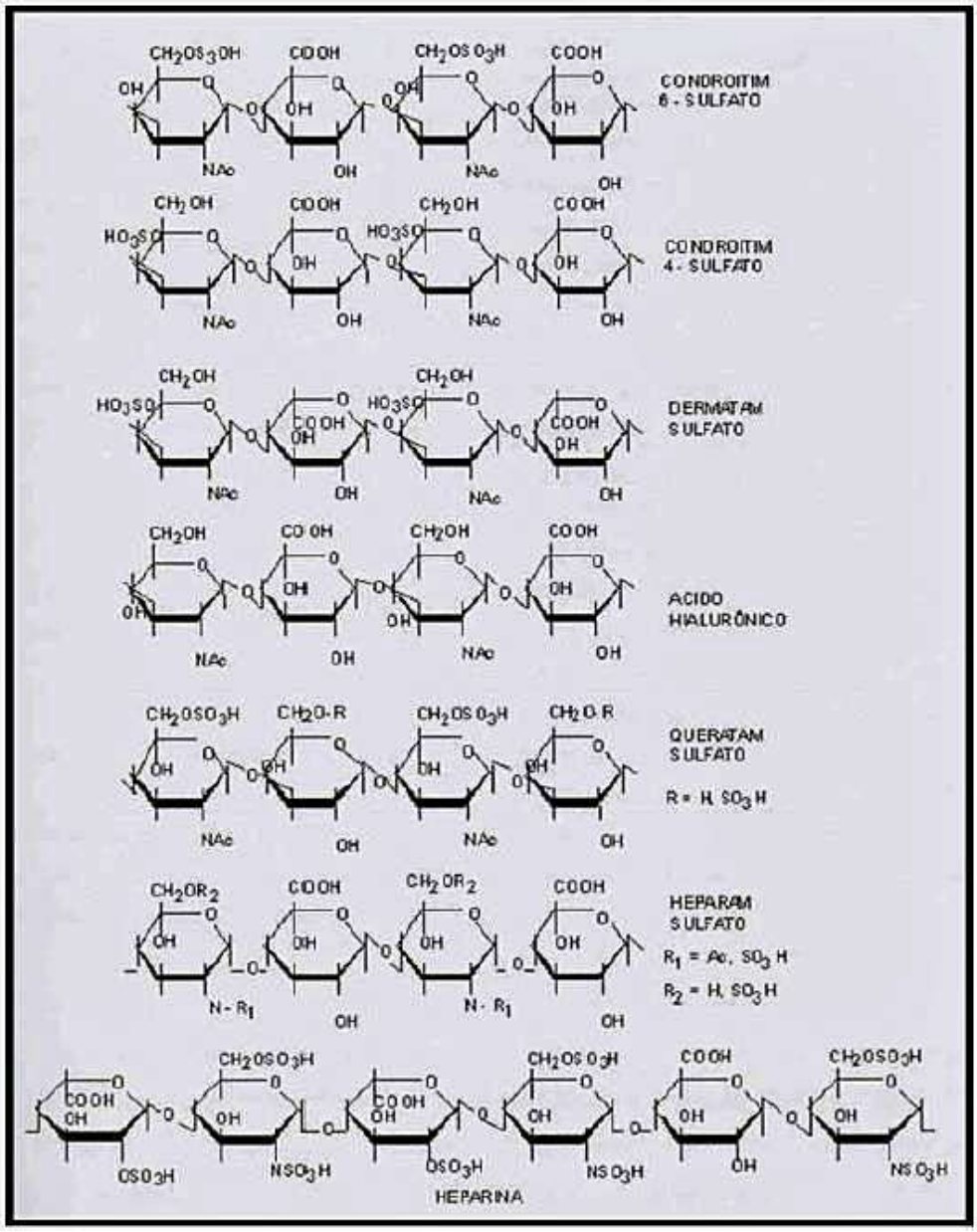

Figura 1 - Unidades estruturais dos principais glicosaminoglicanos (Sampaio et al., 2006).

Tabela 1 - Características estruturais dos glicosaminoglicanos (Sampaio et al., 2006)

Nomenclatura Meyer (1938)	Nomenclatura Jeanloz (1960)	P.M.	Monossacarídeos	Posição do sulfato	Ligação glicosídica
Condroitim sulfato A	Condroitim 4-sulfato	$2\text{-}5 \times 10^4$	N-acetilgalactosamina	4	β(1-4)
			Ácido glucurônico	-	β(1-3)
Condroitim sulfato B	Dermatam sulfato	$2\text{-}5 \times 10^4$	N-acetilgalactosamina	4	β(1-4)
			Ácido glucurônico	-	β(1-3)
			Ácido idurônico	-	α(1-3)
Condroitim sulfato C	Condroitim 6-sulfato	$2\text{-}7 \times 10^4$	N-acetilgalactosamina	6	β(1-4)
			Ácido glucurônico	-	β(1-3)
Ácido hialurônico	Ácido hialurônico	$5\text{-}50 \times 10^5$	N-acetilglucosamina	-	β(1-4)
			Ácido glucurônico	-	β(1-3)
Quérato sulfato	Queratam sulfato	$1\text{-}3 \times 10^4$	N-acetilglucosamina	6	β(1-3)
			galactose	-/6	β(1-4)
Heparitim sulfato	Heparam sulfato	$1\text{-}6 \times 10^4$	Glucosamina	2/6	α(1-4)
			N-acetilglucosamina	-/6	α(1-4)
			Ácido glucurônico	-	β(1-4)
			Ácido idurônico	-/2	α(1-4)
Heparina	Heparina	$1\text{-}6 \times 10^4$	Glucosamina	2/6	α(1-4)
			Ácido glucurônico	-	β(1-4)
			Ácido idurônico	-/2	α(1-4)

O AH, presente na MEC, fornece suporte estrutural e funcional para as células (Gomes et al., 2007, 2013; Lebl et al., 2007; Teixeira Gomes et al., 2009; Nusgens, 2010; Simões et al., 2012). Tem importante papel tanto na remodelação endometrial quanto na embriogênese (Gall, 2010). Pode se ligar aos proteoglicanos e influenciar a adesão e a migração celular (Soto-Suazo et al., 2002; Abaskharoun et al., 2010), o que pode determinar a quantidade de tecido que entrará em apoptose para facilitar a implantação, quando houver gestação, ou a quantidade do fluxo menstrual, na ausência de fecundação (Zorn et al., 1995).

O ácido hialurônico tem também relevante função no estabelecimento do microambiente celular propício ao desenvolvimento de processo proliferativo (Riddle et al., 2010). Tanto as células tumorais quanto as normais exibem diversos sítios de ligação para este glicosaminoglicano, como o CD44 e a

RHAMM (Molécula receptora de AH em processos de migração-específica), em vários tipos celulares, e sua adesão pode interferir na mobilidade celular, atuando no sistema imunológico para a destruição de clones defeituosos relacionados à progressão de neoplasias (Vabres, 2010).

Salamonsen et al. (2001), por imunoistoquímica, registraram dois picos de ácido hialurônico no estroma endometrial humano: o primeiro no meio da fase proliferativa (5º ao 10º dia) e, o outro, no meio da fase secretora (19º - 23º dia), isto é, no período de implantação. Assim, o primeiro pico corresponderia ao tempo de proliferação celular rápida das células indiferenciadas, enquanto o segundo coincidiria com o momento da implantação. Desse modo, alterações na primeira fase do ciclo, com intenso processo mitótico e alteração da matriz poderiam propiciar uma segunda fase inadequada, mesmo com administração de progesterona.

Afify et al. (2005, 2006) estudaram, por imunoistoquímica, a distribuição de ácido hialurônico e de seus receptores (CD44) durante o ciclo menstrual. Referiram haver maior coloração no estroma e nas glândulas durante a fase de implantação do embrião, ou seja, no meio da fase secretora. Contudo, para os autores, inadequação da fase proliferativa teria repercussão sobre essas estruturas endometriais.

A síntese do ácido hialurônico é promovida por três sintases (HASs), codificadas pelos genes de 1 a 3 (HAS1, HAS2 e HAS3). São glicosiltransferases ligadas à superfície interna da membrana plasmática, que usam UDP-α-N-acetil-D-glicosamina e UDP-α-D-glicuronato como substrato para a síntese dos vários tipos de ácido hialurônico, sendo que as cadeias nascentes são secretadas através de “poros” para o meio extracelular (Esko et al., 1991; Fraser et al., 1997; Weigel et al., 1997; Itano et al., 1999; Adamia et al., 2005; Schulz et al., 2007; Weigel e DeAngelis, 2007; Hascall et al., 2014; Vigetti e Passi, 2014) (Figuras 2A e 2B).

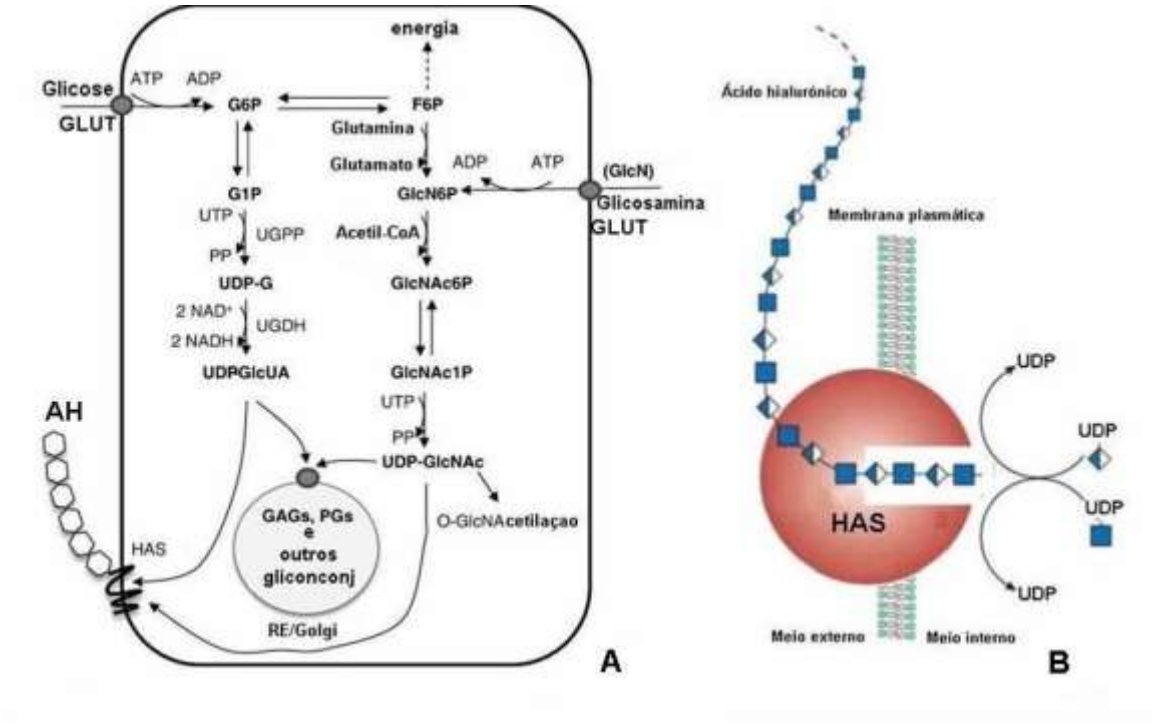

Figura 2. A - Representação esquemática da via de biossíntese do ácido hialurônico e dos proteoglicanos. A glicose e a glicosamina (GlcN) entram na célula através dos transportadores GLUT. A UDP-glicose pirofosforilase (UGPP) e a desidrogenase (UGDH) conduzem, respectivamente, à formação de UDP-glicose (UDP-G) e UDP-GlcUA a partir de glicose-1 fosfato. A UDP-GlcUA e a UDP-GlcNAc podem ser utilizadas diretamente na síntese do AH pelas enzimas localizadas na membrana plasmática ou podem ser transportadas para dentro do RE/complexo de Golgi para a síntese de outros glicoconjugados, especialmente os proteoglicanos. B - Esquema representativo da síntese do ácido hialurônico pelo complexo enzimático localizado na membrana plasmática (Adaptado de Vigetti et al., 2014).

De acordo com Brinck e Heldin (1999), Itano et al. (1999), Heldin (2003), Uchiyama et al. (2005) e Vigetti et al. (2014), cada uma das três isoformas de HAS é capaz de polimerizar o ácido hialurônico. Contudo, formam AH com diferentes massas moleculares e comprimentos (Figura 3), determinando

diferentes funções (Spicer e McDonald, 1998; Brinck e Heldin, 1999; Itano et al., 1999; Jacobson et al., 2000; Heldin, 2003; Itano, 2008; Törrönen et al., 2014). Além disto, esses autores revelaram ainda que diversas proteínas citoplasmáticas interagem especificamente com cada proteína HAS, podendo ter ação importante na sua biossíntese.

São duas as diferenças principais entre as isoformas da HAS: o comprimento da cadeia das moléculas de ácido hialurônico resultante da síntese e a facilidade com que elas podem ser liberadas para a superfície celular (Itano et al., 1999; Stern et al., 2006). As isoformas das HAS possuem 55-71% de similaridade na sequência de aminoácidos.

Deve-se realçar que as enzimas de síntese do ácido hialurônico (HAS) desempenham o papel de iniciar, alongar e translocar as cadeias para o meio extracelular, presumivelmente formando, na membrana celular, estruturas parecidas com poros (Yoshida et al., 2000).

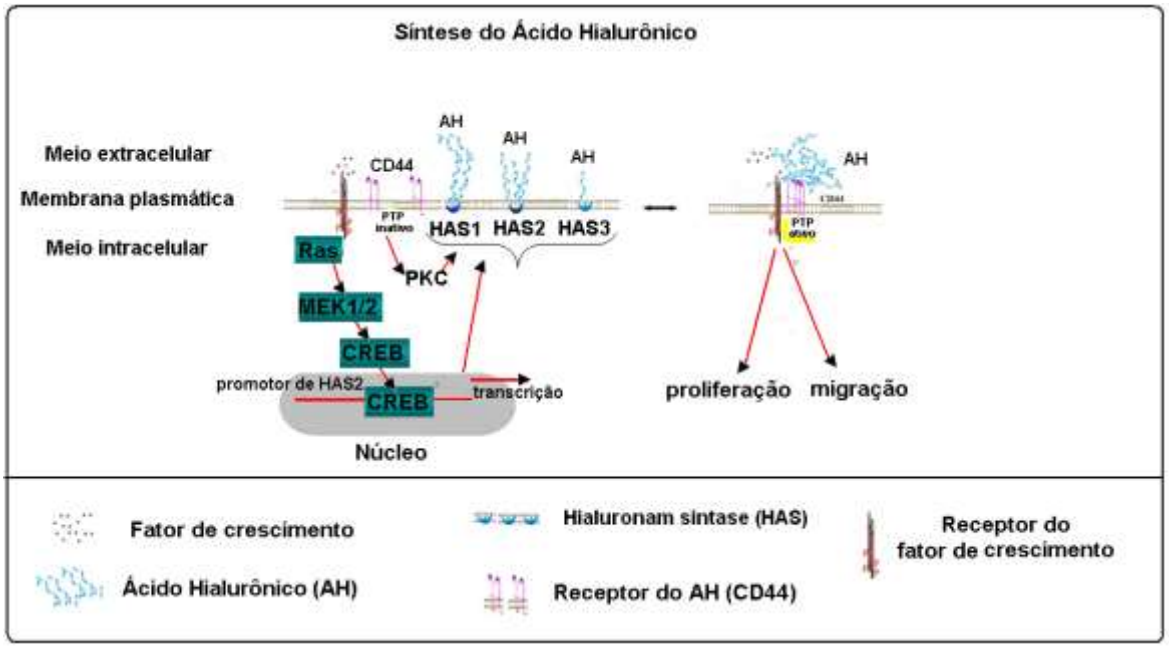

Figura 3 - Esquema representativo da síntese do ácido hialurônico pelas enzimas sintases do ácido hialurônico (HAS1, HAS2 e HAS3) estimuladas pelo fator de crescimento do fibroblasto (FGF) em humano (Adaptado de Uchiyama et al., 2005).

A falta de regulação dos genes HAS causa produção anormal de AH e promoção de processos biológicos anormais, como metástases e perda gestacional (Cordo-Russo et al., 2009). A função das HASs parece ser célula e tecido específicos. A HAS1 mantém nível basal baixo de AH. Já a HAS2 está envolvida na morfogênese, formando um gel que permite a gênese de estruturas embrionárias através da migração e invasão celular. Além disto, estimula a proliferação celular e a angiogênese. A HAS3 parece estar associada ao desenvolvimento e progressão do câncer. No entanto, a função exata das isoenzimas da HAS e seu papel na sinalização celular e os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente elucidados (Adamia et al., 2005).

Uchiyama et al. (2005) estudaram o efeito da progesterona e do estrogênio na expressão e regulação do RNA mensageiro (RNAm) de enzimas responsáveis pela síntese do ácido hialurônico em cultura de fibroblasto da cérvice uterina de camundongas. Notaram que a progesterona inibe a expressão dos níveis do RNAm da enzima HAS1, mas aumenta a da enzima HAS3, sendo ambas dose dependentes. O estrogênio não influenciou a expressão do RNAm das HASs. Esses mesmos autores relataram ainda haver diferenças quanto à massa molecular do ácido hialurônico sintetizado. As HAS1 e HAS2 produziram ácido hialurônico com alta massa molecular (2.000 kDa), enquanto a HAS3, ácido hialurônico com baixa massa molecular (200-300 kDa). Acrescentam-se a esses dados os resultados da pesquisa feita por Takemura et al. (2005), que estudaram as três enzimas HASs em cultura de fibroblasto da cérvice uterina de mulheres grávidas, no primeiro e no terceiro trimestre de gestação, pela análise da expressão gênica por biologia molecular e pela imunoistoquímica. Notaram aumento na expressão da HAS1 e HAS3 no decorrer da gravidez. No entanto, não observaram alterações na HAS2, o que pode sugerir que esta isoenzima não teria influência hormonal em sua expressão.

A rede formada pelo AH com diferentes proteoglicanos na matriz extracelular pode propiciar o início de vários eventos biológicos, como inflamação, proliferação, angiogênese, invasão, transformação e migração (McDonald e Camenisch, 2002; Hascall et al., 2004; Spicer e Tien, 2004). Foi previamente descrito que o AH estimula a secreção de interleucinas (IL) 1 e 8 e de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (Kobayashi et al., 1999). Estas citocinas inflamatórias poderiam interferir na receptividade endometrial (Bourdiec e Akoum, 2014). Assim, o aumento da degradação do AH poderia dar a ele função principal na remodelação da matriz extracelular nesse processo (Takemura et al., 2005).

Os glicosaminoglicanos sulfatados no endométrio estão presentes sob a forma de proteoglicanos (Dreyfuss et al., 2009), para a adequada ação biológica na matriz extracelular. Existem inúmeros tipos de proteoglicanos, alguns de cadeia pequena e ricos em leucina (SRLPs), considerados elementos importantes para homeostase tecidual (Figura 4). Em particular, entre eles realçam decorim, lumicam, biglicam e fibromodulina, por estarem relacionados à fibrilogênese do colágeno, assim como por fornecerem sinais angiogênicos, pró-apoptóticos e de supressão do crescimento celular. São pré-requisitos para bloquear ou inibir o crescimento e a invasão nos tecidos hospedeiros.

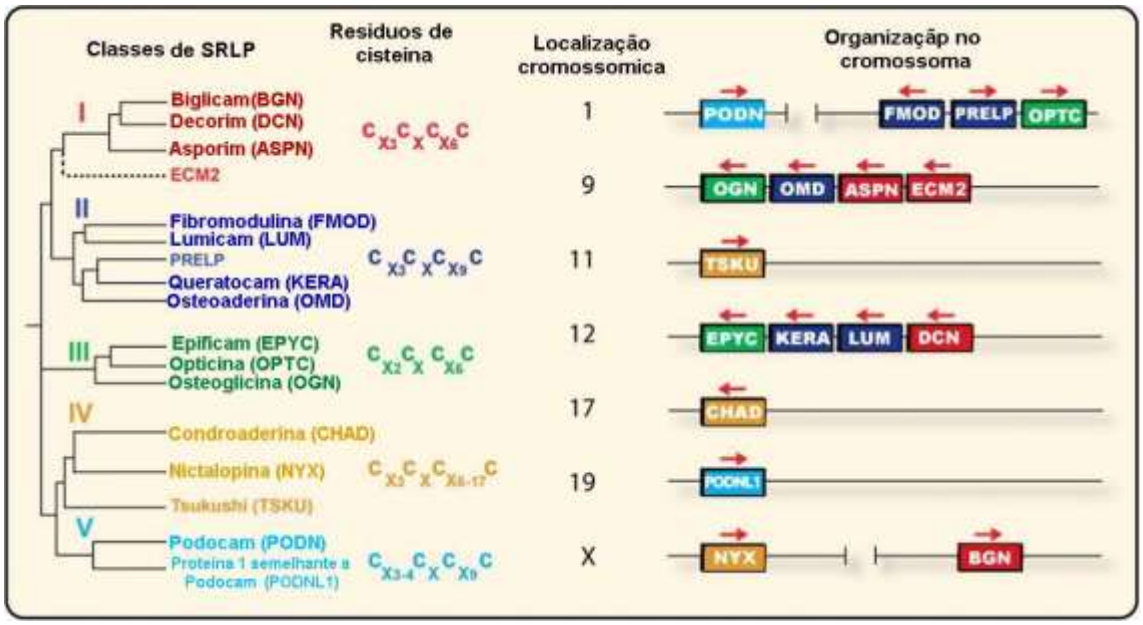

Figura 4 - Esquema mostrando as classes, resíduos de cisteína, localização cromossômica e organização no cromossoma dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (Adaptado de Schaefer e Iozzo, 2008).

A família de proteoglicanos de cadeia pequena ricos em leucina (SLRP) compreende dezessete tipos que partilham homologias estruturais, tais como os resíduos de cisteína, repetições ricas em leucina e pelo menos uma cadeia lateral de glicosaminoglicano. O decorim e o biglicam apresentam semelhanças na sua sequência de aminoácidos, cadeias laterais de condroitim e dermatam sulfato. A fibromodulina e o lumicam apresentam cadeias laterais de queratam sulfato, assim como agrupamentos de resíduos de tirosina-sulfato na região N-terminal da proteína (Schaefer e Iozzo, 2008).

Assim, o lumicam, proteoglicano rico em leucina, formado por cadeias laterais de queratam sulfato, constitui componente importante da córnea, derme, músculo e tecidos conjuntivos. Está relacionado à regulação e polimerização das fibrilas colágenas. A sua ausência promove o aparecimento de proporção significativa de fibras colágenas anormalmente grossas na pele e

na córnea, conforme já foi mostrado à microscopia eletrônica de transmissão (Chen et al., 2010).

O decorim e o biglicam são pequenos proteoglicanos que estão associados às fibrilas de colágeno em todos os tecidos conjuntivos. O decorim apresenta como glicosaminoglicano uma cadeia de condroitim ou dermatam sulfato, com massa molecular de aproximadamente 50 kDa, ligado ao esqueleto proteico de aproximadamente 40 kDa. O biglicam possui duas cadeias de condroitim ou dermatam sulfato. Interagem com os colágenos tipos I e II; esta interação se faz pelo esqueleto proteico e não pela cadeia de GAG. Essa ligação leva a atraso na fibrilogênese do colágeno e pode ter papel importante nas interações interfibrilares. É referido ainda que o fator de transformação de crescimento beta (TGF-β) está presente na região promotora do gene do decorim, o que sugere que este se liga ao TGF-β inibindo sua atividade (Iozzo e Cohen, 1994). Provavelmente, o TGF-β formado nas células atua na regulação da proliferação e diferenciação das células endometriais *in vivo*. Por esta razão, o decorim pode atuar de modo significativo na regulação da proliferação do endométrio por meio do controle do TGF-β (Iozzo e Cohen, 1994).

Outro pequeno proteoglicano rico em leucina, a fibromodulina, com massa molecular de 59 kDa, liga-se ao colágeno. Sua principal função é manter a estrutura das fibras colágenas. Experimentos *in vivo* sugerem que está envolvido nos processos de adesão, divisão, diferenciação e migração celular. Parece também ser responsável pela regulação da organização da matriz extracelular (Rydell-Törmänen et al., 2014).

Estudos em camundongas mostraram que os proteoglicanos ricos em leucina presentes no útero sofrem rápida remodelação algumas horas após a fertilização, sugerindo que os níveis dos hormônios ovarianos modulam sua síntese e degradação (San Martin et al., 2003). Também foram encontradas alterações no padrão de distribuição dessas moléculas (biglicam, decorim fibromodulina e lumicam) no útero de camundongas durante o ciclo estral. Assim, poderiam estar sob controle ovariano e, provavelmente, participariam na preparação do endométrio para a implantação do embrião e decidualização

(Salgado et al., 2009). Possivelmente, também poderiam ter influência no fluxo menstrual na SOP.

Em mulheres, a imunorreatividade para o biglicam foi detectada na superfície endometrial e no epitélio glandular, com imunomarcação difusa no compartimento estromal durante todo o ciclo menstrual. Esta marcação mostrou-se muito fraca nos capilares endometriais na fase proliferativa, sendo mais intensa na fase secretora. A imunorreatividade para o decorim foi detectada também nos epitélios superficial e glandular, com fraca reatividade no compartimento estromal. A imunorreatividade para decorim nos capilares endometriais estava ausente ou fracamente positiva ao longo do ciclo menstrual (Kitaya e Yasuo, 2009).

Pelo exposto, os GAGs e os proteoglicanos poderiam estar direta ou indiretamente envolvidos com diversos processos como remodelação endometrial, implantação do embrião, reações imunológicas, angiogênese, carcinogênese e metastatização, entre outros. Este fato nos levou a estudar a distribuição e arranjo dos GAGs e proteoglicanos no endométrio de mulheres com SOP e sua eventual relação com a infertilidade. Assim, interessamo-nos em estudar o ácido hialurônico e suas enzimas de síntese (HASs), como também os proteoglicanos de cadeia pequena ricos em leucina, no endométrio de mulheres com a síndrome dos ovários policísticos durante a fase proliferativa (predomínio da ação estrínica), comparando-os com os de mulheres com ciclo menstrual regular.

2 Objetivos

2.1 Geral

Avaliar os glicosaminoglicanos e os pequenos proteoglicanos ricos em leucina no endométrio de pacientes com síndrome dos ovários policísticos, comparando aos de mulheres com ciclos menstruais regulares na fase proliferativa.

2.2 Específicos

1 - Avaliar e quantificar os glicosaminoglicanos sulfatados (heparam, dermatam e condroitim sulfatos);

2 - Quantificar os níveis de ácido hialurônico;

3 - Analisar, por imunoistoquímica, a presença e distribuição do ácido hialurônico e das suas enzimas de síntese (HAS1, HAS2 e HAS3);

4 - Avaliar, por imunoistoquímica, a presença e distribuição dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina biglicam, decorim, fibromodulina e lumicam;

5 - Analisar, por *western blotting*, as enzimas de síntese do ácido hialurônico (HAS1, HAS2 e HAS3) e os pequenos proteoglicanos ricos em leucina biglicam, decorim, fibromodulina e lumicam.

3 Pacientes e métodos

3.1 Desenho do estudo

Foi realizado estudo do tipo transversal, no período de 2011 a 2014. Selecionaram-se pacientes portadoras da síndrome dos ovários policísticos (SOP) e mulheres com ciclos menstruais regulares com indicação de esterilização tubária na Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

3.1.1 Consentimento

Todas as mulheres receberam informação pormenorizada sobre o estudo e somente foram incluídas as que concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido pós-informado. Este estudo foi iniciado somente após a sua aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HC-FMUSP (Anexos A e B).

3.2 Pacientes

O estudo incluiu 22 mulheres na menacme, com idade variável entre 20 e 35 anos, atendidas na Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da FMUSP (HC-FMUSP), no período de 2011 a 2014. Foram divididas em dois grupos: 1) G-SOP – pacientes com diagnóstico de síndrome dos ovários policísticos (SOP) segundo os critérios da *Androgen Excess Society*-PCOS (Azziz et al., 2006); 2) G-C (controle) - mulheres com ciclos menstruais regulares, na fase proliferativa do ciclo menstrual, com indicação de esterilização tubária.

Todas foram submetidas a anamnese, exames físico geral e ginecológico, bem como à determinação do índice de massa corporal (IMC) e da circunferência abdominal (CA). Além disto, efetuaram-se exame citológico cervicovaginal e ultrassonografia pélvica. Para caracterizar as pacientes com

síndrome dos ovários policísticos foram realizadas dosagens séricas de hormônio estimulante da tireoide (TSH), tetraiodotironina livre (T4L), testosterona total, sulfato de deidroepiandrosterona (DHEA-S), 17alfa-hidroxiprogesterona (17α-OH P), insulina e glicemia de jejum.

3.2.1 Critérios de inclusão

G-SOP (síndrome dos ovários policísticos): mulheres com idade de 20 a 35 anos, sem uso de medicamentos hormonais nos últimos seis meses, com diagnóstico clínico e/ou laboratorial compatível com SOP;

G-C (controle): mulheres com idade de 20 a 35 anos, sem uso de medicamentos hormonais nos últimos seis meses, com ciclos menstruais regulares, com indicação de esterilização tubária.

3.2.2 Critérios de não inclusão

Os critérios de não inclusão utilizados na seleção de ambos os grupos (G-SOP e G-C) foram os seguintes: gravidez, antecedente de neoplasia maligna, hipotireoidismo, hiperprolactinemia, síndrome de Cushing, deficiência enzimática da suprarrenal, uso de hormônios tais como contraceptivos hormonais (pelo menos nos últimos seis meses), glicocorticoides, fármacos antiandrogênios, agentes indutores de ovulação, fármacos anti-hipertensivos, hipoglicemiantes ou sensibilizadores dos receptores de insulina e de anti-inflamatórios.

3.2.3 Fluxograma do estudo

As pacientes, após conhecimento do projeto e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, elaborado de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, foram incluídas no estudo, o qual seguiu o seguinte fluxograma (Figura 5):

Figura 5 - Fluxograma do estudo.

- Inicialmente, foram realizados anamnese e exames físico geral e ginecológico. Os dados antropométricos foram coletados: peso corporal (em kg), estatura (em m) e circunferência abdominal (em cm). O índice de massa corporal (IMC) foi calculado dividindo-se o peso corporal (kg) pelo quadrado da estatura (m^2). A circunferência abdominal foi medida na menor região localizada entre o último arco costal e a crista ilíaca.

- O escore clínico de hirsutismo foi estimado com modificações do originalmente proposto por Ferriman e Gallwey (1961). Nove áreas do corpo

(lábio superior, mento, peito, região dorsal, região lombar, abdome superior, abdome inferior, braço e coxa) receberam pontuação de 0 a 4, de acordo com a quantidade de pelos espessos e pigmentados existentes. O escore 0 representa a ausência total de pelos terminais, enquanto a nota 4 indica grande quantidade de pelos com pigmentação escura (Figura 6) (Azziz et al., 2009). O escore clínico de hirsutismo foi definido pela soma das notas de cada região analisada. O escore maior ou igual a 8 foi utilizado como ponto de corte para indicar a presença de hirsutismo (Hatch et al., 1981).

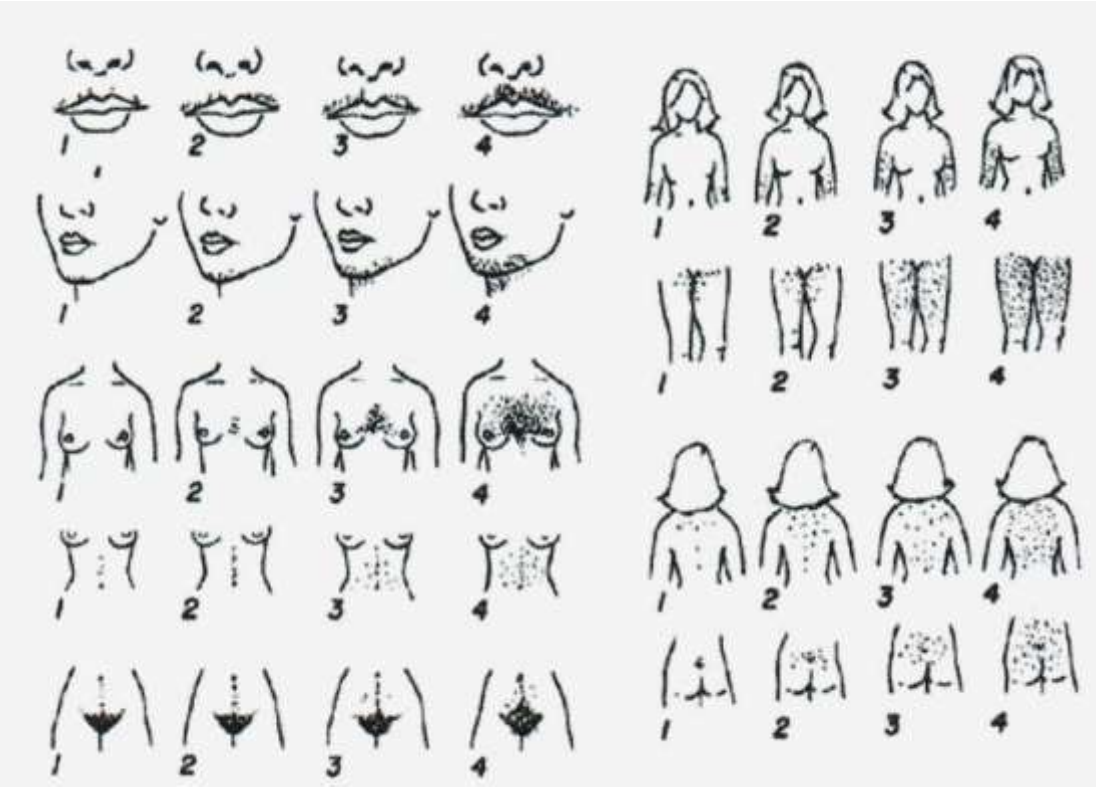

Figura 6 - Guia ilustrado para mensuração do escore clínico de hirsutismo (Adaptado de Rosenfield, 1986).

- Obtenção de amostras sanguíneas e realização de ultrassonografia pélvica transvaginal ou transabdominal. O padrão ecográfico de ovário

policístico foi considerado quando pelo menos um dos ovários apresentou 12 ou mais folículos e/ou volume superior a 10 cm^3 (Jonard et al., 2003).

- Realização de biopsia endometrial das mulheres com ciclos eumenorreicos (ciclo menstrual de 22 a 36 dias) na fase proliferativa do ciclo menstrual (8° – 12° dia) baseada na anamnese e comprovada posteriormente com o resultado da datação endometrial realizada por patologista (Noyes et al., 1975; Belsey e Pinol, 1997; Fehring et al., 2006). Nas pacientes do grupo SOP, as biopsias foram efetuadas em qualquer período.

3.2.4 Coleta do sangue e exames subsidiários

As coletas sanguíneas para os exames hormonais e metabólicos ocorreram ao redor do 8° ao 12º dia do ciclo menstrual no grupo controle; já no grupo SOP em amenorreia, foram realizadas em qualquer dia do ciclo, entre as 8 e as 10 horas da manhã. As participantes foram orientadas a manter jejum nas 12 horas anteriores à coleta de sangue venoso para a determinação sérica dos seguintes exames: hormônio estimulante da tireoide (TSH), tetraiodotironina livre (T4L), testosterona total (TT), prolactina (PRL), sulfato de deidroepiandrosterona (DHEA-S), 17alfa-hidroxiprogesterona (17α-OH P), hormônio gonadotrófico coriônico (b-hCG), bem como glicemia e insulina de jejum (Tabela 2).

O índice HOMA (homeostatic model assessment índex) foi calculado de acordo com o estudo de Wallace et al. (2004): HOMA = Insulina (μIU/mL) X Glicose (mmol/L)/22,5.

Tabela 2 – Imunoensaios realizados no Laboratório Central do HC-FMUSP e valores de referência para mulheres na idade reprodutiva

Teste	Método	Valores de referência
17α-OH P	Radioimunoensaio	Fase folicular: 0,1-0,8 ng/mL
DHEA-S	Quimioluminescência	35-430 µg/dL
Glicose	Enzimático (hexoquinase)	Soro/plasma 60-100 mg/dL
TT	Quimioluminescência	0,14-0,76 ng/mL
Insulina	Quimioluminescência	3,0-25,0 µUI/mL
TSH	Quimioluminescência	0,35-5,50 µUI/mL
T4L	Quimioluminescência	0,70-1,90 ng/dL

Legenda: 17α-OH P = 17alfa-hidroxiprogesterona, DHEA-S = sulfato de deidroepiandrosterona, TT = testosterona total, TSH = hormônio estimulante da tireoide, T4L = tetraiodotironina livre.

Cabe ressaltar que alguns testes foram utilizados apenas para fins diagnósticos e para avaliação dos critérios de inclusão ou não inclusão das participantes, não sendo considerados na análise dos resultados.

Os dados obtidos a partir da anamnese, dos exames físico geral e ginecológico e dos exames complementares são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Características clínicas e ultrassonográficas das mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP) (médias e desvios-padrão)

Parâmetros	G-C (n=10)	G-SOP (n=10)	Valor de p
Idade (anos)[a]	29,21 ± 2,55	29,09 ± 3,26	0,32
Idade da menarca (anos)[a]	12,20 ± 0,98	11,20± 0,84	0,21
Número de ciclos menstruais por ano (n/ano)[a]	12,81 ± 0,55	3,53 ± 1,40*	< 0,01
Número de partos [b]	2,67 ± 0,65	-	
Índice de Ferrimam e Galley (Escore≥8; Hisurtismo)[a]	2,07 ± 1,54	9,40 ±1,23*	< 0,01
Índice de massa corporal [a] (Kg/m^2)	25,49 ± 2,45	29,01± 4,19*	< 0,05
Circunferência abdominal [c] (cm)	80,06 ± 5,15	94,50 ± 3,50*	< 0,05
Ultrassom			
Volume do ovário direito (cm^3)	5,9 ± 1,9	11,5 ± 2,7*	< 0,01
Volume do ovário esquerdo (cm^3)	6,1 ± 2,0	12,0 ± 2,9*	< 0,01
Médias dos volumes ovarianos (cm^3)	6,0 ± 1,1	11,7 ± 2,9*	< 0.01

a = Teste t não pareado; b = não foi realizado devido a ausência de gravidez no grupo SOP. *p<0,05

Tabela 4 - Valores hormonais e glicemia séricos obtidos das mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP) (médias e desvios-padrão)

Variável	G-C	G-SOP
A (ng/mL)	2,2 ± 0,8	4,2 ± 1,3*
17α-OH P (mg/mL)	17,3 ± 8,4	18,3 ± 7,4
DHEA-S (mg/mL)	421,5 ± 52,10	520,4 ± 82,1*
TT (ng/dL)	35,9 ± 11,7	83,09 ± 24,80*
Insulina (μUI/mL)	8,8 ± 2,9	11,5 ± 6,5
TSH (μUI/mL)	2,8 ± 1,7	2,9 ± 1,6
T4L (ng/mL)	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,3
Glicose (mg/dL)	81,8 ± 8,6	80,2 ± 11,9

Legenda: 17α-OH P = 17alfa-hidroxiprogesterona, DHEA-S = sulfato de deidroepiandrosterona, TT = testosterona total, TSH = hormônio estimulante da tireoide, T4L = tetraiodotironina livre. *$p<0.05$

3.2.5 Obtenção das biopsias endometriais

Nas pacientes com SOP (G-SOP), por terem ciclos anovulatórios, a biopsia do endométrio foi realizada sem a necessidade de se programar a época do ciclo. Para as mulheres do grupo controle (G-C), foi efetuada na fase proliferativa do ciclo menstrual (entre o 8º e o 12º dia).

A biopsia foi feita em sala de exame com o uso de cateter endometrial de Pipelle de Cornier (Cooper Surgical, Trumbull, USA). A técnica utilizada para a biopsia endometrial com o cateter Pipelle incluiu a inserção de espéculo de Graves, com adequada exposição cervical, seguida das seguintes etapas, segundo Serafini (2007): a) assepsia, seguida de limpeza com gaze esterilizada até a completa ausência da presença do antisséptico; b) consideração imaginária do eixo cérvico-uterino; c) moldagem do cateter de acordo com o eixo cérvico-uterino; d) após inspiração profunda da paciente, o colo do útero foi rapidamente exposto; e) inserção delicada do cateter Pipelle até o fundo uterino; f) o êmbolo do cateter Pipelle foi puxado até sua marca final para obtenção de pressão negativa no seu interior; g) a aspiração foi contínua e realizada mediante movimentos finos e milimétricos do cateter, deslocando-o da parede uterina anterior até a região istmo-cervical; h) o cateter foi delicadamente empurrado até o fundo uterino, sendo a abertura do Pipelle orientada para a parede posterior do útero com repetição da manobra descrita no item g. Desta maneira, foi obtida amostra abrangente da cavidade endometrial. Parte das amostras endometriais aspiradas foi fixada em formol a 10% (tampão fosfato) para inclusão histológica em parafina, destinada à datação endometrial e análise imunoistoquímica; outra foi mergulhada em acetona e uma terceira amostra imediatamente mergulhada em nitrogênio líquido para estudo de biologia molecular, sendo mantida à temperatura de -80ºC. Cuidados foram tomados para que sangue, muco ou ambos não fossem colocados no material a ser congelado.

3.3 Métodos

3.3.1 Análise histológica

Parte das amostras endometriais de cada paciente foi fixada em solução tamponada de formaldeído por 8 horas em temperatura ambiente. A seguir, foram desidratadas e incluídas em parafina segundo métodos histológicos de rotina. Dos blocos foram obtidos cortes de 4 µm, os quais foram submetidos ao método de coloração pela hematoxilina e eosina (H.E.) visando à confirmação da fase do ciclo menstrual. Para tanto, utilizaram-se os critérios propostos por

Noyes et al. (1975). Na análise morfológica foi empregado microscópio de luz, da marca Carl Zeiss, com objetivas variando de 4 a 400X.

3.3.2 Extração e determinação dos glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs)

Os fragmentos endometriais foram inicialmente lavados em PBS, sendo logo em seguida mergulhado em uma solução de acetona e mantidos *overnight* a 4ºC. A seguir, o material foi fragmentado e seco em estufa com temperatura entre 40ºC e 50ºC, durante duas horas. Obteve-se assim um pó-cetônico que, após secagem, foi pesado e incubado com maxatase (Biocon, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (4,0 mg/ml em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8 com NaCl 1 M na proporção de 20 mg de maxatase/g de pó cetônico), durante 18 horas a 60ºC. Terminada a incubação, retirou-se 10% do volume para análise do ácido hialurônico. Ao restante, foi adicionado ácido tricloro acético (TCA) para concentração final de 10%, sempre em banho de gelo e sob agitação constante (função: precipitação das proteínas). Após centrifugação (4000*g* por 10 minutos), o sobrenadante foi precipitado com dois volumes de metanol e mantido a –20ºC, por 18 horas (função: precipitação dos glicosaminoglicanos sulfatados). Após centrifugação a 5000*g* por 15 minutos o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco (são os GAGs) mantido em estufa a 50ºC por uma hora (função: evaporação do metanol) sendo ressuspenso em água destilada (H2Od). Após esse processo de extração, os glicosaminoglicanos sulfatados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para identificação e quantificação.

3.3.2.1 Eletroforese em gel de agarose

Utilizou-se o método de eletroforese em gel de agarose desenvolvido por Jaques et al. (1968) e modificado por Dietrich e Dietrich (1976), que consiste na aplicação dos compostos obtidos ao gel de agarose 0,6%, em tampão 1,3 diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0. A corrida

eletroforética foi realizada em câmara refrigerada, e diferença de potencial de 100V, por aproximadamente uma hora.

Após a migração, os glicosaminoglicanos foram precipitados no gel por brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 0,1% por um tempo mínimo de duas horas. Depois de seco, sob calor e ventilação, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em etanol 50% e ácido acético a 1% por 15 minutos, e descorado com a mesma solução sem o corante (etanol 50% e ácido acético a 1%).

A origem da eletroforese corresponde ao pólo negativo, uma vez que os glicosaminoglicanos têm carga aniônica e, portanto, migram para o pólo positivo. Na eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, os glicosaminoglicanos são separados pela capacidade de interação com a diamina do tampão. Assim, os compostos que menos interagem com o diaminopropano, têm maior migração eletroforética. Portanto, o tampão PDA discrimina por ordem decrescente de mobilidade eletroforética, respectivamente, o condroitim sulfato (CS), o dermatam sulfato (DS) e o heparam sulfato (HS).

A identificação de cada glicosaminoglicano sulfatado foi realizada comparando-se a migração eletroforética das amostras com a de padrões conhecidos e purificados: condroitim 4-sulfato extraído de cartilagem de baleia, condroitim 6-sulfato extraído de cartilagem de tubarão e dermatam sulfato extraído da mucosa intestinal bovina, obtidos da Seikagaku Kogyo Co (Tóquio, Japão); heparam sulfato de pulmão bovino (purificado na Disciplina de Biologia Molecular da UNIFESP-EPM, como descrito por Dietrich e Nader (1974) e Dietrich et al. (1983.

Estes mesmos padrões também foram usados para a determinação quantitativa das amostras, através de densitometria a 525 nm. Os resultados foram expressos em µg de GAG/mg de pó cetônico (média e desvio-padrão).

3.3.3 Quantificação do ácido hialurônico

O método utilizado foi desenvolvido na Disciplina de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Trata-se de método fluorométrico para a determinação do ácido hialurônico em fluidos biológicos, utilizando, para tal, sondas de ligação ao ácido hialurônico (Martins et al., 2003). A sonda é isolada de cartilagem nasal bovina e é constituída da região globular do agrecam (um proteoglicano formado por um esqueleto proteico ao qual se ligam cadeias de queratam sulfato e condroitim sulfato) e pela proteína de ligação do ácido hialurônico. A sonda é usada imobilizada em placas de ELISA, à semelhança de um anticorpo de captura, como sonda biotinilada, funcionando nesse último caso como um anticorpo secundário marcado (Figura 7).

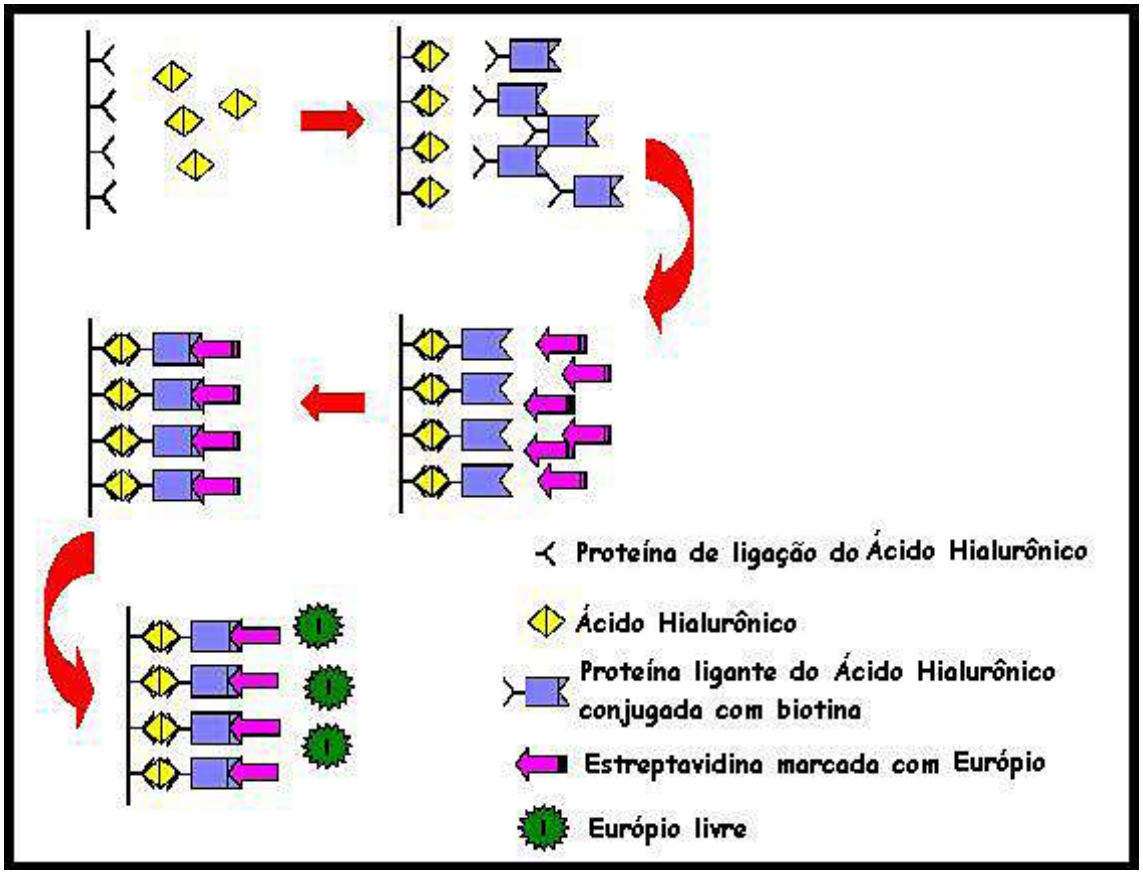

Figura 7 - Esquema do método fluorométrico (Adaptado de Martins et al., 2003).

3.3.3.1 Quantificação do ácido hialurônico pelo método fluorométrico ELISA-like

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

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

3.3.3.2 Ensaio tipo sanduíche do ácido hialurônico

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

A seguir, foram adicionados 100 µL da sonda do ácido hialurônico (proteína de ligação extraída da cartilagem bovina biotinilada – 1 mg/mL) diluída 1:5000 ou 1:10000 no tampão de ensaio. A placa foi agitada por duas horas e depois lavada com o tampão de lavagem.

Após lavagem, foram adicionados à placa 100 µL por poço de estreptavidina, marcada com Europio (Delfia Eu-labelling kit), diluída em 1:10000 em tampão de ensaio. Em sequência, agitou-se por uma hora e, a seguir, foi tratada pelo tampão de lavagem. Por fim, adicionou-se solução de

realce (200 µL por poço), agitou-se por 5 minutos e depois a placa foi lida em fluorímetro. As amostras foram analisadas em triplicata e as placas lidas em fluorímetro Wallac 2-Victor *Multilabell Counter* (Pearkin Elmer Life Sciences). Este método permite detectar até 0,2 µg de ácido hialurônico por mg (Martins et al., 2003).

Finalmente, foi adicionada a solução de *Enhancement* (200 µL/poço) (Wallac Ou, Turku, Finlândia) e a placa agitada por cinco minutos, antes de ser lida no fluorímetro (Wallac Ou, Turku, Finlândia). Foi obtido, para cada composto, um valor em ng/mL, que é normalizado por µg de GAGs no tecido, baseado no peso seco inicial do pó cetônico. Todas as amostras foram realizadas em triplicata, sendo o limite de detecção do método de 0,2 µg/L.

3.4 Método imunoistoquímico

3.4.1 Imunoistoquímica para determinar a distribuição do ácido hialurônico

Cortes do endométrio de 5 µm foram tratados com sonda biotinilada anti-proteína de ligação do ácido hialurônico (HABP) de cartilagem bovina, desenvolvida no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (Lebl et al., 2007). Inicialmente foi bloqueada, nos cortes, a atividade da peroxidase endógena por incubação com peróxido de hidrogênio a 3% durante 35 minutos. Em seguida, foram incubados durante 30 minutos com albumina de soro bovino (BSA) 1% em soro fisiológico tamponado com fosfato. Posteriomente, foi adicionado HABP conjugado a biotina (1:100) em solução salina tamponada com fosfato contendo 1% de BSA por 1 hora. A seguir, os cortes foram incubados durante 1 hora com estreptavidina conjugada com peroxidase (1:500, Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido) com 0,05% de tetracloridrato de diaminobenzidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e contrastadas pela hematoxilina de Harris. Como controle negativo utilizaram-se cortes tratados com hialuronidase proveniente de *Streptomyces hyalurolyticus* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

3.4.2 Imunoistoquímica para identificação das HASs e dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina

A expressão de HAS1, HAS2, HAS3, decorim, lumicam, fibromodulina e biglicam foi investigada empregando-se anticorpos específicos em cortes histológicos de parafina. Para tanto, os cortes coletados em lâminas silanizadas foram, inicialmente, desparafinados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação dos cortes com peróxido de hidrogênio a 3% durante 5 minutos. Os cortes foram incubados em tampão (pH 6,0) citrato de sódio 10mM a 95ºC por 20 minutos. Os sítios de ligação não específicos foram bloqueados com 2% PBS-BSA por uma hora. Os anticorpos utilizados estão expressos na Tabela 5.

Para identificação da ligação do anticorpo secundário, utilizou-se o *kit* amplificador (Vectastaing, ABC). Os cortes foram incubados com a solução padrão do *kit* por uma hora a 37ºC, e após incubação as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4 por seis vezes e novamente incubadas com outra solução tampão do *kit*, por 15 minutos, e, em seguida, foram lavadas com tampão PBS, pH 7,4 por três vezes.

As reações foram reveladas com o sistema estreptavidina-peroxidase (Dako Cytomation, USA) e, como cromógeno, foi utilizado o 3,3-diaminobenzidina (DAB), sendo os cortes posteriormente contrastados pela hematoxilina de Harris. Como controle negativo foram utilizados cortes incubados com imunoglobulina não específica (DAKO Cytomation, USA) no lugar do anticorpo primário.

Adotou-se como padrão de positividade o aparecimento de coloração marrom-acastanhada na região da matriz extracelular ou na região dos limites celulares.

Tabela 5 - Características dos anticorpos empregados para feitura do procedimento de imunoistoquímica

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Tipo	Diluição	Controle positivo
HAS1	SC-34020	Santa Cruz®	Policlonal	1:100	Tecido embrionário
HAS2	SC-34067	Santa Cruz®	Policlonal	1:100	Tumor de ovário
HAS3	SC-3404	Santa Cruz®	Policlonal	1:100	Tumor de Colo do útero
Decorim	Ab175404	Abcam®	Policlonal	1:300	Mama
Lumicam	Ab168348	Abcam®	Policlonal	1:1000	Pele
Fibromodulina	Bs-12362R	Bioss®	Policlonal	1:1500	Tecido embrionário
Biglicam	Bs-7552R	Bioss®	Policlonal	1:100	Cartilagem

3.4.3 Análise da Imunoexpressão

Para a quantificação dos parâmetros analisados, imagens foram capturadas através de câmera de alta resolução (AxioCam-MCR da Carl Zeiss) adaptada a microscópio de luz (AxioLab, Carl Zeiss), com objetivas de 40X, que foram transmitidas a computador com programa windows XP. Para a avaliação imunoistoquímica dos parâmetros analisados, utilizamos a análise semiquantitativa de escores (H) como descrita por Panzan et al. (2013), ou seja, 0 para reatividade negativa, e de 1 a 4 segundo o grau de intensidade da reatividade.

3.4.4 “Western Blotting”

Os fragmentos de endométrio presentes nos tubos *eppendorf* mergulhados no nitrogênio líquido foram retirados, triturados e processados com 500 µL do tampão de extração de proteínas (RIPA – 150mM NaCl, 50mM Tris, 1% Nonidet P-40, 0,15 SDS, 5 mg/mL Deoxicolato de Sódio) acrescidos

de 10 mg/mL de inibidores de protease, sendo a concentração proteica determinada pelo método colorimétrico de Lowry et al. (1951). Quantidades iguais de proteínas, previamente reduzidas com mercaptoetanol e fervidas a 100ºC, por 10 minutos, foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. As proteínas foram transferidas para a membrana de fluoreto de polivinilidene (PVDF) por transferência úmida, sendo esta bloqueada com solução de albumina 5% em TBS-T (mistura de Tris HCL 0,05M, NaCL 0,15M e Tween 0,05%), *overnight*.

Posteriormente, foram incubadas com anticorpo primário diluído em albumina 1% *overnight*, a temperatura reduzida no agitador (Tabela 6). Foi feita lavagem com TBS-T (3X de 15 minutos) e, a seguir, incubação com anticorpo secundário conjugado à HRP por aproximadamente duas horas. As membranas foram lavadas novamente com TBS-T (3X de 5 minutos) e fez-se a revelação. A expressão da actina foi utilizada como controle da qualidade da técnica.

Tabela 6 – Características dos anticorpos para realização do procedimento do *western blotting*

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Tipo	Diluição
HAS1	SC-34020	Bioss®	Policlonal	1:500
HAS2	SC-34067	Bioss®	Policlonal	1:500
HAS3	SC-3404	Bioss®	Policlonal	1:500
Decorim	Ab175404	Abcam®	Policlonal	1:500
Lumicam	Ab168348	Abcam®	Monoclonal	1:500
Fibromodulina	Bs-12362R	Bioss®	Policlonal	1:1500
Biglicam	Bs-7552R	Bioss®	Policlonal	1:100
beta-actina	Bs-12362R	Calbiochem®	Monoclonal	1:500
GAPDH	Bs-12362R	Calbiochem®	Monoclonal	1:500

3.5 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado nos dados da quantificação do ácido hialurônico (médias e desvios-padrão), levando em conta um poder da amostra em 80% (erro tipo II - beta). Aplicou-se a seguinte fórmula: $N = (Z^2.S^2)/d^2$, onde N = tamanho da amostra; Z = número de desvios–padrão, que no caso de distribuição normal é de 1,96; S = desvios-padrão das médias e d = diferença das médias (Weyne, 2004). Portanto, o número total de casos necessário foi de 20.

3.6 Método Estatístico

Após análise da distribuição dos dados (normal), utilizou-se o teste *t* de *student* não pareado. Foi fixado *p* menor que 5% (erro tipo I ou alfa, $p \leq 0,05$) para significância estatística. Os cálculos foram feitos com o programa SPSS versão13 (SPSS, Chicago, IL).

4 Resultados

4.1 Histomorfológicos

O endométrio das mulheres do G-C apresentaram epitélio de revestimento cilíndrico simples e lâmina própria com inúmeros fibroblastos, com núcleos elípticos e nucléolos bem evidentes (Figuras 8A e 8B). Nota-se a presença de inúmeras glândulas tubulares retas, revestidas por epitélio cilíndrico simples (Figura 8C). Tanto no epitélio superficial quanto no glandular e na lâmina própria observa-se a presença de figuras de mitose (Figura 8B). No G-SOP, o endométrio mostra as mesmas características; no entanto, os epitélios superficial e glandular achavam-se mais espessados e a lâmina própria, localizada logo abaixo dos epitélios, tinham inúmeros leucócitos (Figura 8D). Verificaram-se ainda, neste último grupo, algumas células em apoptose (Figuras 8D e 8E).

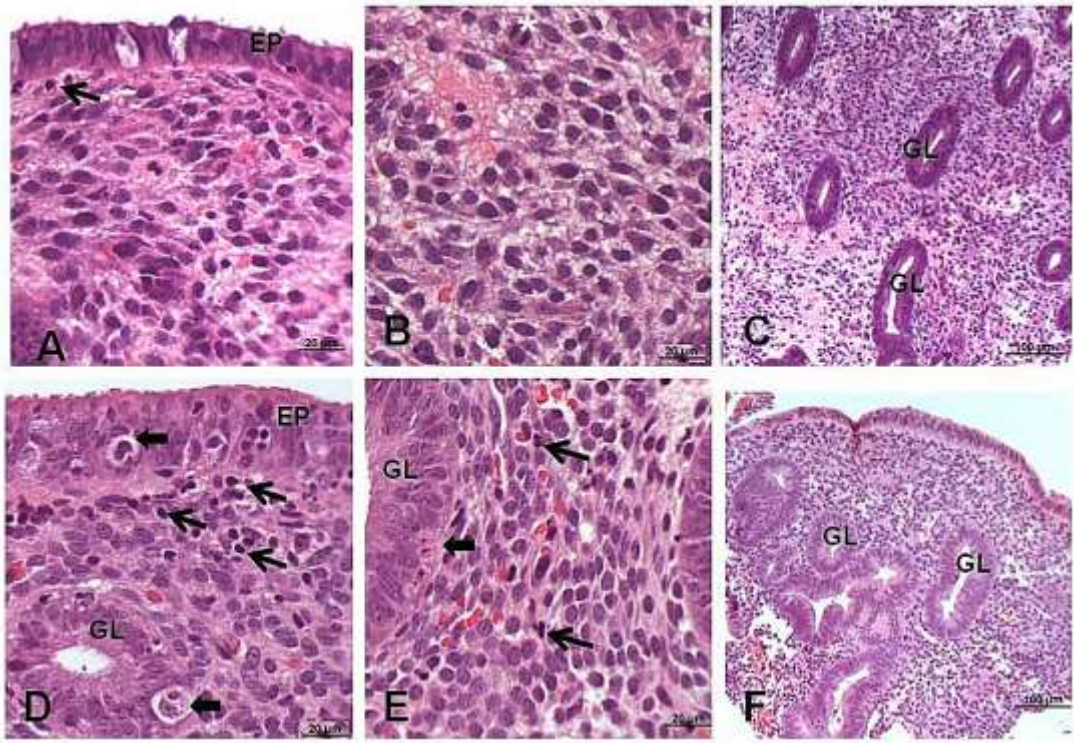

Figura 8 - Fotomicrografias do endométrio de mulheres na fase proliferativa (A, B e C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (D, E e F). Notar epitélios superficial (EP) e glandular (GL) mais espessos, assim como maior concentração de leucócitos na lâmina própria no grupo SOP em D e E, quando comparado ao G-C em A e B (setas finas). Observar ainda figuras típicas de apoptose em D e E (setas espessas) (*figura de mitose). H.E. A e D = 200X, B e E = 400X, C e F = 100X.

4.2 Quantificação dos GAGs

O comportamento eletroforético em gel de agarose dos endométrios de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de portadoras da síndrome dos ovários policisticos (G-SOP) está expresso nas Figuras 9 e 10. A análise bioquímica revelou a presença de condroitim sulfato (CS), heparam sulfato (HS) e traços de dermatam sulfato (DS) no endométrio das mulheres do grupo G-C e com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP). Os resultados foram expressos em miligrama de GAG por grama de tecido seco. A concentração total de glicosaminoglicanos sulfatados mostrou-se maior no G-C (2,27 ± 0,50 mg/g) do que no G-SOP (1,76 ± 0,31 mg/g). O glicosaminoglicano predominante foi o condroitim sulfato em ambos os grupos. Assim, a concentração obtida de CS em relação ao total de glicosaminoglicanos foi 94,2% e 89,8% nos grupos de mulheres com ciclos menstruais regulares e com síndrome dos ovários policísticos, respectivamente, sendo esta diferença significante. Já a concentração de heparam sulfato em relação ao total de glicosaminoglicanos foi 5,8% no G-C e 10,2% no G-SOP, sendo esta diferença não significante. A eletroforese mostrou ainda traços de dermatam sulfato em ambos os grupos (Tabela 7).

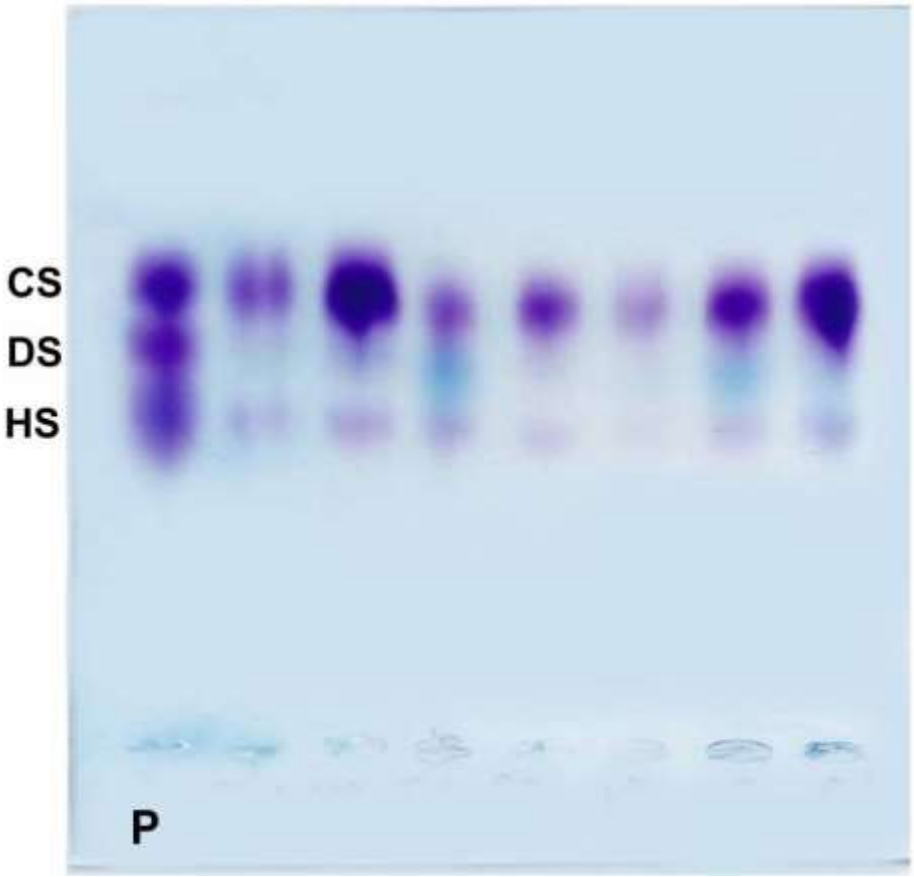

Figura 9 - Perfil dos glicosaminoglicanos, em gel de agarose, presentes no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C). CS – condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS – heparam sulfato. P – ponto de origem da eletroforese.

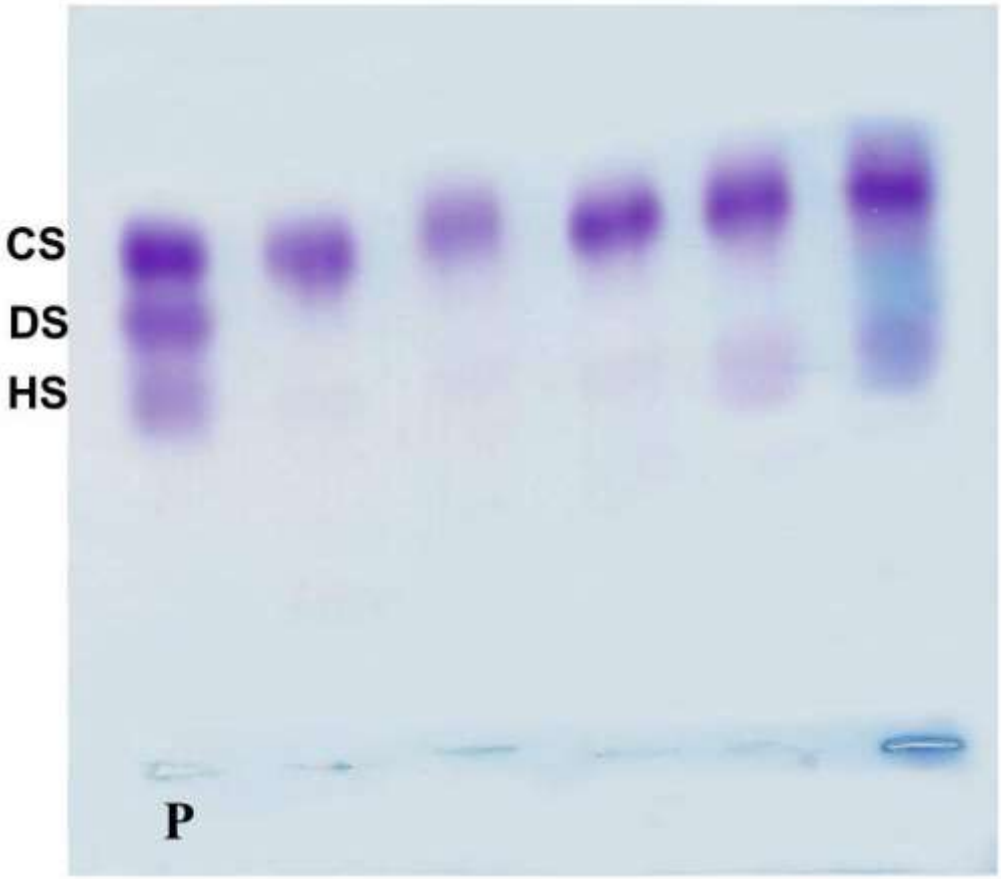

Figura 10 - Perfil dos glicosaminoglicanos, em gel de agarose, presentes no endométrio de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP). CS – condroitim sulfato, DS - dermatam sulfato, HS – heparam sulfato. P – ponto de origem da eletroforese.

Tabela 7 – Quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados (M ± DP) no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP)

	GRUPOS	
Dosagem (mg/g)	**G-C (n=10)**	**G-SOP (n=10)**
Glicosaminoglicanos sulfatados	2,27 ± 0,50*	1,76 ± 0,31
Condroitim sulfato	2,14 ± 0,55*	1,58 ± 0,65
Dermatam sulfato	Traços	Traços
Heparam sulfato	0,13 ± 0,08	0,18 ± 0,09

***p<0,05 quando comparado ao G-SOP**

4.3 Quantificação do ácido hialurônico

A análise bioquímica mostrou haver maior quantidade de ácido hialurônico no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual do que no de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-C= 0,39 ± 0,04 µg/mg > G-SOP= 0,06 ± 0,02 µg/mg; $p<0,01$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Quantificação do ácido hialurônico (M ± DP) no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP)

GRUPOS	AH (µg/mg de pó cetônico)
G-C (n=10)	0,39 ±0,04*
G-SOP (n=10)	0,06 ±0,02

*p<0,01 quando comparado ao G-SOP

4.4 Imunoistoquímica

Os resultados da detecção imunoistoquímica do ácido hialurônico e das enzimas de síntese do ácido hialurônico (HAS1, HAS2 e HAS3) estão mostrados na Figura 11 e os dados dos escores na Tabela 9. A distribuição espacial dos glicosaminoglicanos (carboxilados e sulfatados) no endométrio foi semelhante em ambos os grupos. Estava presente em todo o estroma, sendo mais concentrado em torno dos vasos sanguíneos e das glândulas. Além disto, observou-se também a deposição desses glicosaminoglicanos nas regiões da membrana basal. O mesmo ocorreu em relação às enzimas do ácido hialurônico que estavam presentes principalmente no estroma endometrial.

Os dados da detecção dos proteoglicanos ricos em leucina estão mostrados na Figura 12; seus escores encontram-se na Tabela 9. Da mesma maneira que os glicosaminoglicanos, os proteoglicanos estão presentes por todo o estroma, aparecendo também na membrana basal dos vasos, do epitélio superficial e das glândulas endometriais. Tanto o decorim quanto o lumicam foram mais evidentes no endométrio de mulheres com SOP.

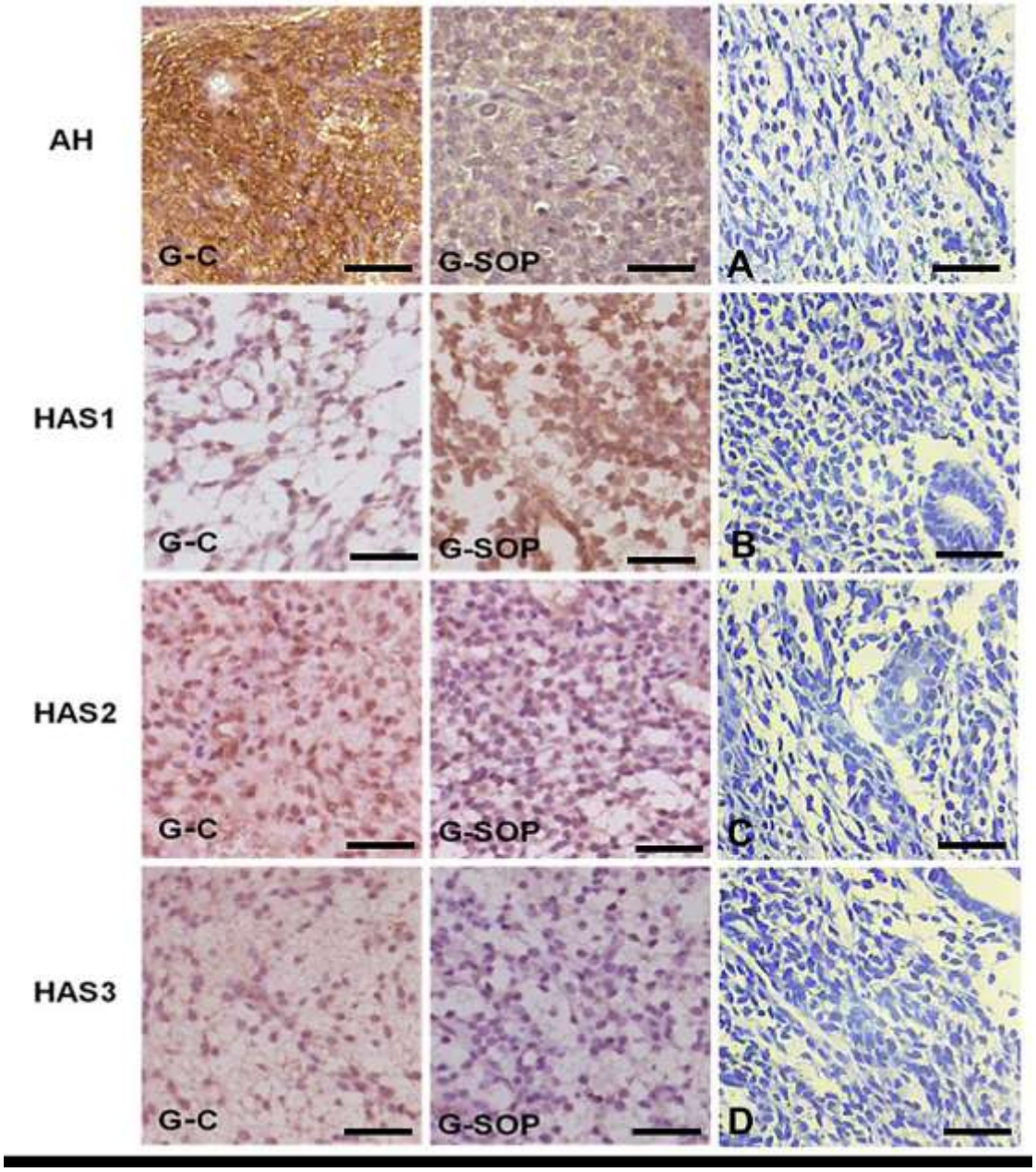

Figura 11 - Fotomicrografias de cortes de endométrio de mulheres com ciclos menstruais regulares na fase proliferativa (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP) submetidos a métodos imunoistoquímicos para identificação do ácido hialurônico (AH) e das enzimas de síntese do ácido hialurônico (HAS1, HAS2 e HAS3). Em A, B, C e D estão expressos os controles negativos das reações. Barra = 20µm.

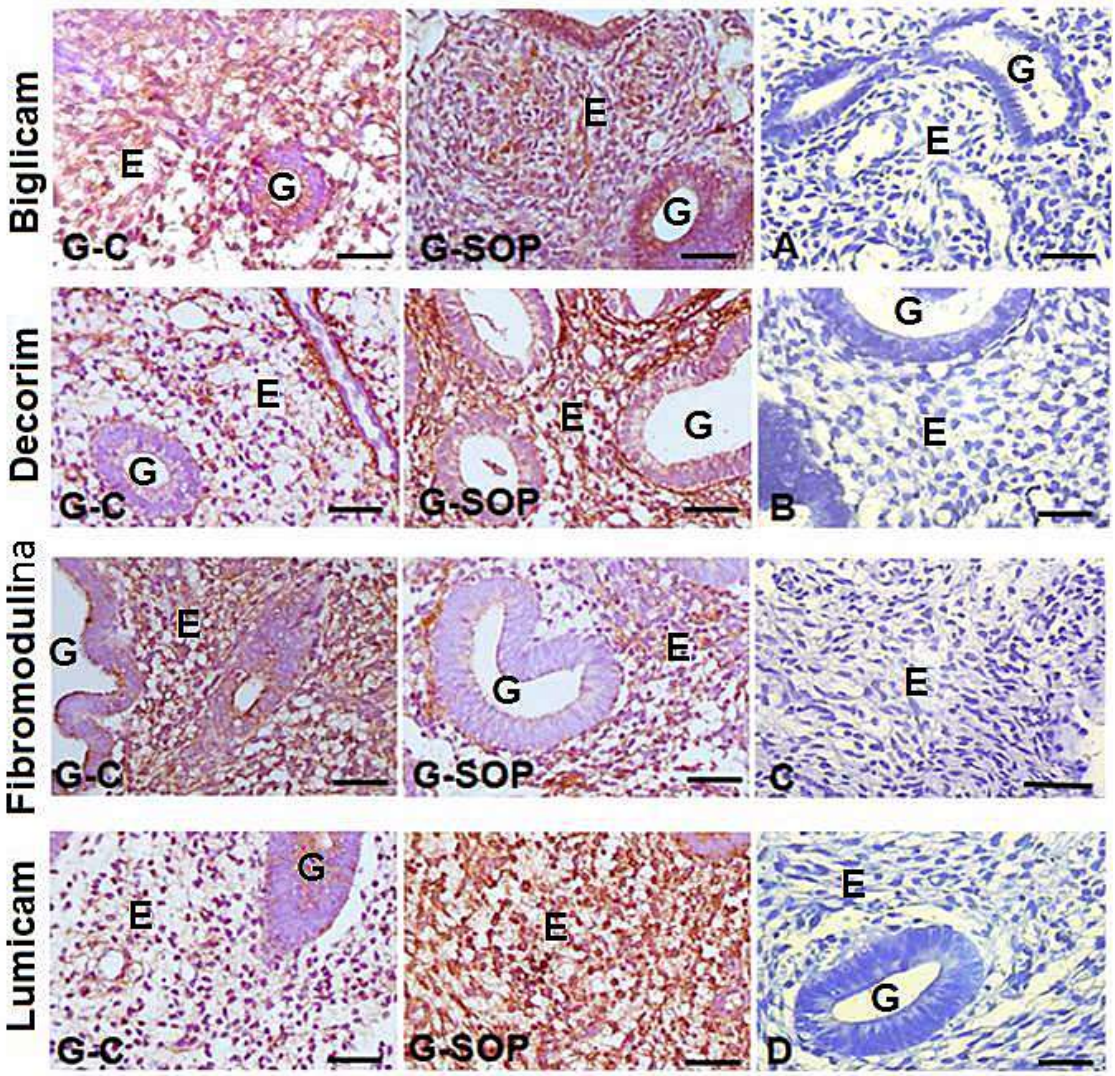

Figura 12 - Fotomicrografias de cortes de endométrio de mulheres com ciclos menstruais regulares na fase proliferativa (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP), submetidos a métodos imunoistoquímicos para identificação de biglicam, decorim, fibromodulina e lumicam. Em A, B, C e D estão expressos os controles negativos das respectivas reações. Barra = 20µm.

Tabela 9 – Análise semiquantitativa (escores) das enzimas de síntese do ácido hialurônico (HAS1, HAS2 e HAS3) e dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (M ± DP) no estroma endometrial de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP)

Grupos	Anti HAS1	Anti HAS2	Anti HAS3	Anti Decorim	Anti Biglicam	Anti Lumicam	Anti Fibromodulina
G-C	1,1±0,2*	1,2±0,1*	2,1±0,4*	1,9±0,3*	2,1±0,7	2,5±0,5*	2,1±0,2
G-SOP	3,5±0,3	1,8±0,2	0,8±0,3	2,8±0,5	2,4±0,6	3,8±0,4	1,7±0,2

*p<0,05 quando comparado a G-SOP.

4.5 *Western Blotting*

O *western blotting* mostrou alta concentração de HAS1 e HAS2 no endométrio de pacientes com a síndrome dos ovários policísticos. Já a concentração de HAS3 apresentou-se pouco aumentada no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual. Os dados do *western blotting* das HAS e dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina estão expressos nas Figuras 13, 14 e Tabela 10.

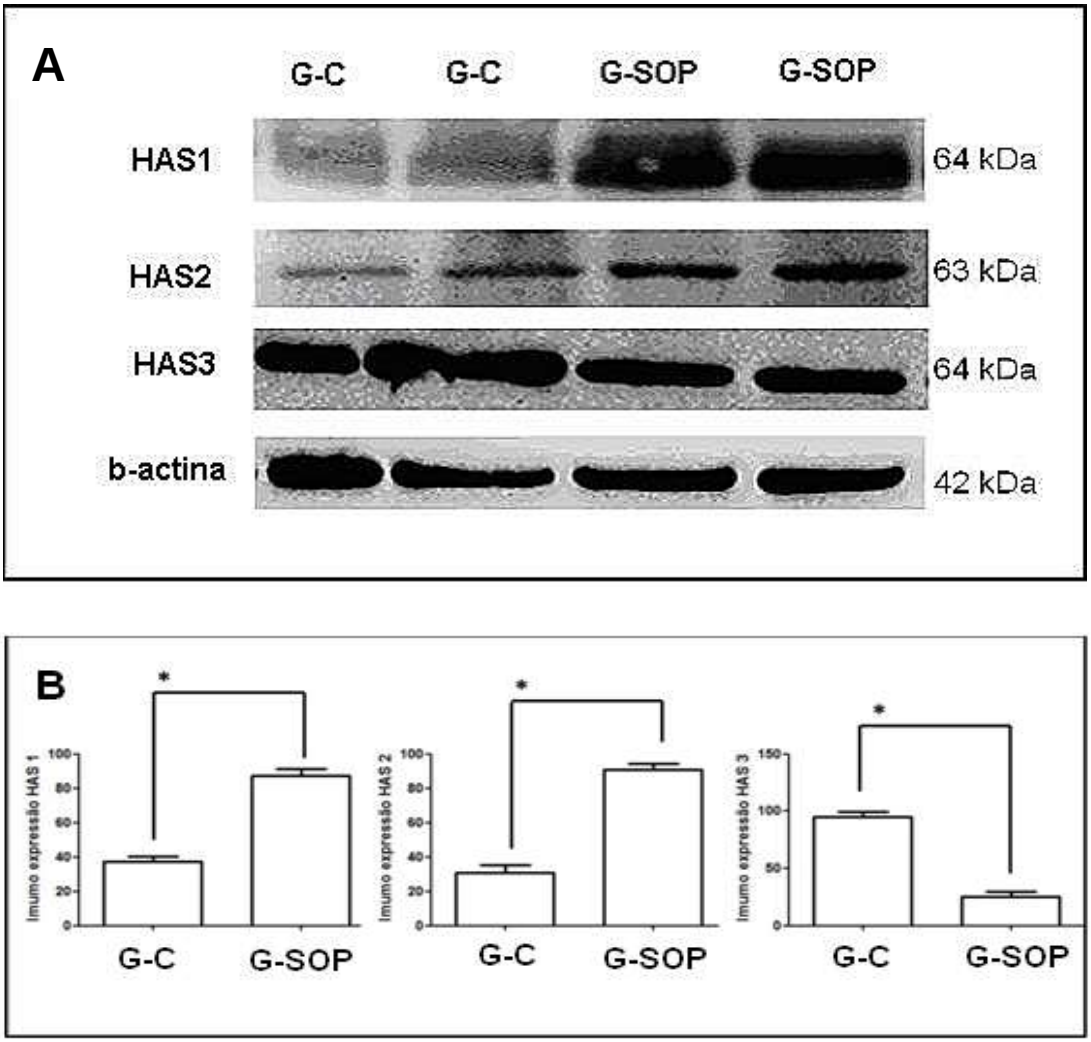

Figura 13 - Em A nota-se no gel de poliacrilamina a expressão da detecção por *western blotting* da imunomarcação das proteínas HAS1, HAS2 e HAS3 no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP). Em B os gráficos representam a expressão das sintase do ácido hialurônico em relação à beta-actina expressa em pixels. Os valores representam média ± S.E.M. Ambas as análises foram significantes ($p<0,05$*).

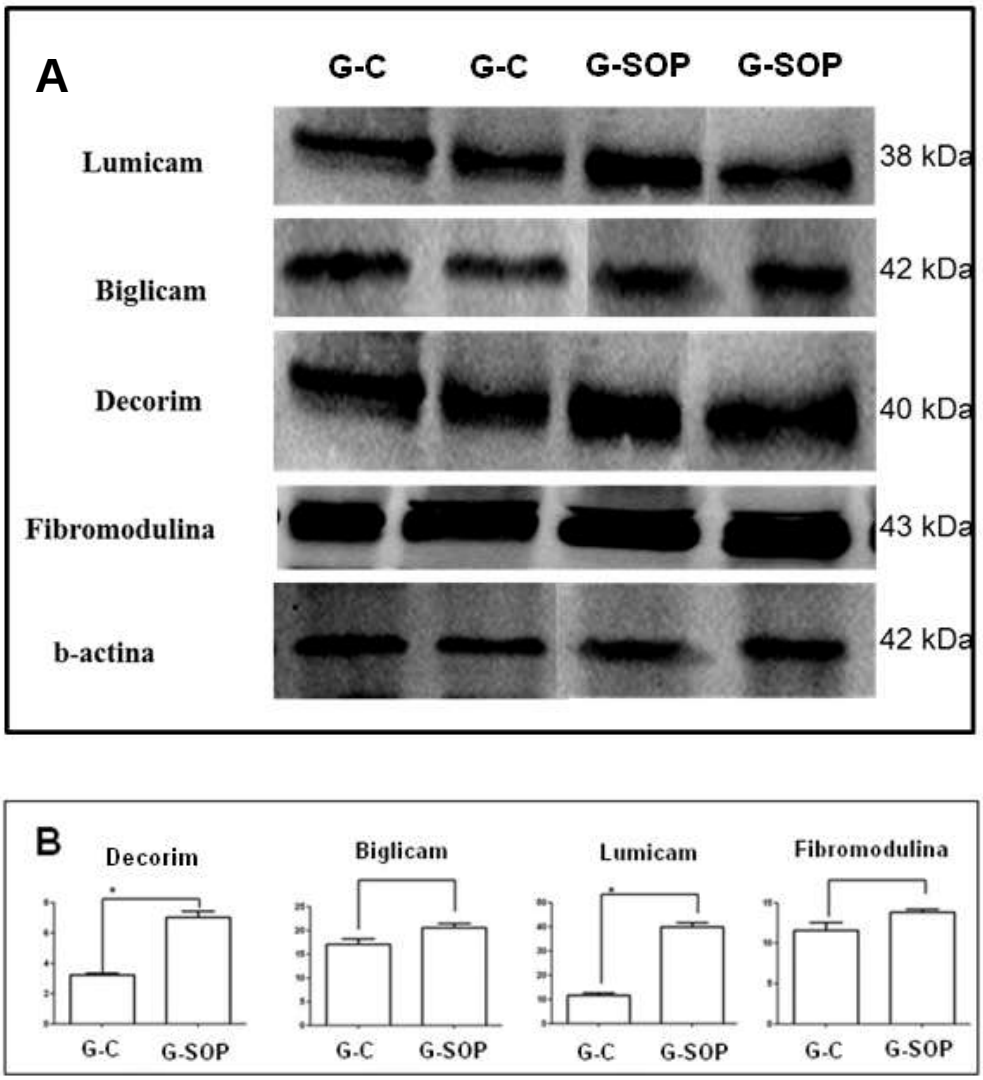

Figura 14 - Em A nota-se no gel de poliacrilamina a expressão da detecção por *western blotting* dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (decorim, biglicam, lumicam e fibromodulina) no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP). Em B os gráficos representam a imunomarcação dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (decorim, biglicam, lumicam e fibromodulina) em relação à beta-actina expressa em pixels. Os valores representam média ± S.E.M. Ambas as análises foram significantes (P<0,05*).

Tabela 10 – Expressão das sintases e de pequenos proteoglicanos ricos em leucina no estroma endometrial de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual (G-C) e de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (G-SOP). Os valores foram obtidos pela densitometria da eletroforese em gel de policrilamida de cada proteína em relação à actina usada como controle interno

Grupos	Anti HAS1	Anti HAS2	Anti HAS3	Anti Decorim	Anti Biglicam	Anti Lumicam	Anti Fibromodulina
G-C	19,0±0,2*	15,9±0,1*	15,9±0,4*	3,4±0,3*	17,5±5,7	12,1±0,5*	11,9±2,7
G-SOP	52,2±0,3	33,4±0,2	4,1±0,3	7,6±0,5	21,1±4,6	40,7±0,4	15,1±3,2

*$p<0,05$ quando comparado a G-SOP.

5 Discussão

O endométrio desempenha importante papel no processo de implantação, bem como no controle do fluxo menstrual (Tanaka et al., 2009; Garry et al., 2010; Lockwood, 2011). A adequada composição estrutural, tanto epitelial quanto estromal, é necessária para o ciclo menstrual regular. Outrossim, a interação entre as células endometriais e a matriz extracelular é essencial para a homeostase tecidual e a organização endometrial, isto é, o controle da proliferação, apoptose, motilidade de fatores de crescimento, leucócitos e da secreção celular. Tal fato decorre da presença de receptores transmembrana que fazem a ligação do meio intracelular com a matriz extracelular através de seus domínios extracelulares (Burghardt et al., 2002). Assim, alterações na composição da matriz extracelular, determinariam modificações estruturais e funcionais do endométrio.

No ciclo menstrual de mulheres eumenorreicas, há intensa remodelação da matriz extracelular, com síntese e degradação de seus componentes teciduais. Está relacionada às variações hormonais e tem como objetivo, preparar o endométrio para a implantação (Achache e Revel, 2006). Neste particular, desempenha papel de realce o ácido hialurônico e os pequenos proteoglicanos ricos em leucina (decorim, lumicam, biglicam e fibromodulina), os quais modulam a ação dos fatores de crescimento, bem como das substâncias relacionadas ao processo inflamatório local, que pode influenciar o crescimento do tecido e a morte celular.

Além da influência dos glicosaminoglicanos no padrão menstrual, os proteoglicanos também participam do controle da proliferação celular, o que possivelmente diminui o risco de desenvolver câncer endometrial (Afify et al., 2005). Alguns investigadores sugerem ainda que os glicosaminoglicanos atuariam sobre citocinas pró-inflamatórias, como fatores de crescimento tumoral e outras vias do sistema inflamatório local, regulando a invasão de leucócitos e a homeostase celular (Orian-Rousseau e Sleeman, 2014). Portanto, a menor síntese destas substâncias contribuiria para que ocorra um

desequilíbrio no estroma endometrial, possibilitando tanto o surgimento de sangramento uterino anormal, inadequada receptividade do endométrio e maior risco de desenvolvimento de lesões proliferativas precursoras de carcinoma endometrial do tipo I (Haoula et al., 2012; Barry et al., 2014).

Para podermos comparar a estrutura endometrial de pacientes com síndrome dos ovários policísticos, escolhemos, como grupo controle, mulheres que apresentavam ciclos menstruais regulares na fase proliferativa, onde prevalece a ação estrogênica. Para termos certeza de que eram férteis, selecionamos mulheres que já tinham tido filhos, com indicação para esterilização tubária. As participantes do grupo SOP foram selecionadas no ambulatório do Setor de Hiperandrogenismo da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sem tratamento prévio, para não influenciar os resultados. Além disso, adotamos os critérios da AES (2006), que estabelece a necessidade de haver hiperandrogenismo clínico ou laboratorial (Azziz et al., 2009).

O endométrio é tecido alvo para ação dos esteroides sexuais, incluindo estrogênio, progesterona e androgênios, onde o processo de proliferação, diferenciação e composição celular dependem de seu sincronismo (Noe et al., 1999). A ação dos receptores de hormônios sexuais ocorre tanto no componente epitelial quanto no estromal. Os androgênios, em especial, teriam ação mais marcante nas células estromais, induzindo a apoptose durante a fase proliferativa, antagonizando em parte a ação do estrogênio (Mertens et al., 1996; Cloke e Christian, 2012). Na segunda fase do ciclo, alguns investigadores registraram aumento da síntese de androgênios e também maior expressão de genes relacionados à ativação de seu receptor, envolvidos na organização citoesquelética, na motilidade e no controle da proliferação celular, auxiliando a progesterona a antagonizar o efeito estrogênico (Ito et al., 2002; Wang et al., 2011; Cloke e Christian, 2012).

Com relação aos nossos resultados histomorfológicos, a datação endometrial foi feita pelo mesmo histologista que não conhecia a qual grupo a mulher pertencia. Devemos mencionar que, do total de pacientes incluídas na avaliação, duas do grupo SOP apresentaram endométrio com hiperplasia, tendo

sido excluídas do estudo, pois poderiam ter expressão gênica diferente do epitélio proliferativo (Afify et al., 2005).

A morfologia do endométrio das mulheres com SOP tinha, em geral, maior espessura epitelial (superficial e glandular) e maior concentração de leucócitos, localizados de preferência logo abaixo do epitélio superficial, que são características da ação estrínica (Kodaman e Taylor, 2004). Além disso, notamos a presença, tanto no epitélio superficial quanto no glandular, de figuras típicas de mitose e de apoptose que, em geral, devem-se à ação dos estrogênios e androgênios, respectivamente (Avellaira et al., 2006). Outros investigadores também encontraram resultados semelhantes aos nossos (Shah et al., 2010). Simões et al. (2013), em estudo imunoistoquímico, referem maior atividade proliferativa na lâmina própria e no epitélio glandular de mulheres normais na fase proliferativa do ciclo menstrual em relação às com síndrome dos ovários policísticos.

Deve-se mencionar que o crescimento e a diferenciação do endométrio na SOP são também influenciados por androgênios, insulina, fatores de crescimento e interleucinas, os quais estão aumentados nessas mulheres (Apparao et al., 2002; Giudice, 2006; Batista et al., 2012; Lopes et al., 2014; Vélez e Motta, 2014; Akram e Roohi, 2015). Sem o efeito regulatório da progesterona, a ação mitogênica estrínica junto aos fatores de crescimento e a insulina poderiam levar a crescimento endometrial desordenado (Cheung, 2001; Giudice, 2006).

Com relação ao perfil dos glicosaminoglicanos sulfatados encontramos no endométrio do grupo controle, bem como no do grupo SOP, maior conteúdo de condroitim sulfato e baixos teores de heparam sulfato e traços não quantificáveis de dermatam sulfato.

Giordano et al. (2015) encontraram maior concentração de heparam sulfato no endométrio de mulheres com SOP do que em mulheres normais. Relacionaram esse achado a uma possível modificação na interface materno-fetal, o que contribuiria para a infertilidade. Referem, ainda, que o heparam sulfato presente no endometrio poderia ser um marcador preditivo de futuro risco de neoplasia.

Nossos dados relativos aos glicosaminoglicanos são similares aos reportados por Nasciutti et al. (2006). Esses autores caracterizaram, por métodos bioquímicos, histoquímicos e imunoistoquímicos, os glicosaminoglicanos no endométrio de mulheres nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual regular. Notaram haver predominância de condroitim sulfato e pequenas quantidades de dermatam e heparam sulfato, sendo que o condroitim sulfato se encontrava distribuído em geral pelo estroma, em torno das glândulas endometriais. Não verificaram haver diferenças importantes na imunomarcação entre as fases proliferativa e secretora. Deve-se mencionar que caracterizaram apenas os glicosaminoglicanos; não fizeram avaliação da sua concentração. Sugeriram que os glicosaminoglicanos participariam da estruturação e no grau de hidratação do endométrio. Ademais, referiram que o condroitim sulfato poderia estar relacionado ao armazenamento de fatores de crescimento e modulação dos processos de angiogênese cíclicos, ou seja, teriam papel na proteção endometrial. Nossos resultados mostraram diminuição do teor de condrotim sulfato e do ácido hialurônico no endométrio de pacientes com SOP. Possivelmente, esta queda estaria relacionada a menor hidratação, o que poderia alterar o processo de implantação, influenciando também no conteúdo de fatores de crescimento e citocinas (Lucariello et al., 2015).

Entre nossos objetivos, procuramos averiguar a concentração e a distribuição do ácido hialurônico no endométrio. Para tanto, além da dosagem bioquímica, avaliamos a sua distribuição utilizando anticorpo contra o peptídeo de ligação altamente específico (Lebl et al., 2007). Observamos que a sua distribuição ocorreu em todo o estroma endometrial, estando de acordo com os dados obtidos por Salamonsen et al. (2001). Notamos, ainda, marcação mais evidente no endométrio de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual do que nas portadoras de SOP. Sabe-se que o ácido hialurônico, além de estar relacionado com a hidratação, fornece suportes estrutural e funcional para as células (Gomes et al., 2013).

Com relação às enzimas de sintese do ácido hialurônico, verificamos que as enzimas HAS1 e HAS2 acharam-se aumentadas no endométrio das mulheres

com SOP. No entanto, a HAS3 encontrava-se elevada no endométrio de mulheres sem SOP na primeira fase do ciclo menstrual.

Como foi referido, as enzimas HAS1 e a HAS2 estão relacionadas com a produção de ácido hialurônico de alto peso molecular. Assim, seria esperado encontrarmos maior concentração e quantidade deste glicosaminoglicano carboxilado no endométrio de mulheres com SOP, o que não foi observado. Nas pacientes com SOP, em virtude da ação estrogênica persistente, poderia haver maior degradação do AH. Já nas mulheres sem SOP, com ciclos regulares, ao contrário, haveria maior concentração de AH de menor peso molecular, o que favoreceria proliferação e diferenciação celular mais equilibrada (Marei et al., 2013).

Freudenberger et al. (2011) referem que a ação da HAS1 é inibida pelos estrogênios, levando à inibição da formação de uma matriz altamente hidratada, diminuindo a proliferação e a neovascularização. Além disto, a síntese do AH pode ser regulada por inúmeros fatores, entre os quais podemos citar os fatores de crescimento e as citocinas, incluindo fatores de crescimento transformador-beta/membros da família da proteína morfogenética óssea, interleucina-1 beta, fator de necrose tumoral-alfa, fator de crescimento epidermal e fator de crescimento de queratinócitos, dependendo do tipo celular (Spicer e Tien, 2004). Estes fatores podem acelerar também a degradação do AH, principalmente de alto peso molecular.

Há vários tipos de AH, com diferentes pesos moleculares, em todos os tecidos; sua quantidade é ajustada pela expressão das diferentes enzimas de síntese e de degradação, resultando em alterações estruturais e bioquímicas que podem estar relacionadas a diferentes efeitos biológicos (Raheem et al., 2013). A função do AH varia na dependência do seu tamanho. Assim, o de alto peso molecular, devido às suas propriedades físico-higroscópicas e viscoelásticas, é antiangiogênico, imunossupressor e inibe a migração celular (Balazs e Gibbs 1970; Deed et al. 1997; Lee e Spicer, 2000).

Por outro lado, as moléculas de AH de baixo peso molecular estão relacionadas à migração ou às respostas de proliferação celular exagerada (Aruffo et al., 1990; Aruffo, 1996; Lee e Spicer, 2000; Orian-Rousseau e

Sleeman, 2014). Têm ainda ação angiogênica e antiapoptótica (Stern et al., 2006).

Assim, a redução do AH total e/ou a predominância do AH de baixo peso molecular podem facilitar o processo de proliferação endometrial. Em consequência, haveria alteração estrutural e funcional do endométrio.

Além do ácido hialurônico interessamo-nos em avaliar os pequenos proteoglicanos que são membros da família ricos em leucina (SLRPs) da matriz extracelular. Atuam como efetores potentes em algumas vias de sinalização celular (Hocking et al., 1998; Iozzo, 1999; Chen e Birk, 2013; Halper et al., 2014). Alguns trabalhos relacionam esses proteoglicanos ricos em leucina ao processo de implantação, à placentação e à invasao tumoral, porém, são escassos os relacionados ao ciclo menstrual (San-Martim et al., 2003; Kirn-Safran et al., 2008; Kitaya e Yasou, 2009, Salgado et al., 2011). Salgado et al. (2011) referem que a expressão e distribuição de decorim, biglicam, lumicam e fibromodulina no endométrio e no miométrio de camundongas são dose hormônio-dependentes. Deste modo, seriam importantes no preparo do endométrio para a implantação.

Em nosso estudo encontramos imunomarcação mais intensa para decorim e lumicam no endométrio de mulheres com SOP. Já a imunomarcação para o biglicam e a fibromodulina foi semelhante em ambos os gupos de estudo. Kitaya e Yasuo (2009) relataram ser a imunorreatividade para o biglicam fraca ou ausente durante todo o ciclo menstrual normal. Alguns investigadores referem que, em meio de cultura, a progesterona aumenta a expressão de biglicam nas células endometriais. Este, por sua vez, atuaria junto com a selectina no sistema imune local (Kitaya e Yasuo, 2009).

Além disso, o decorim e o lumicam estão relacionados com a atividade antiproliferativa local (Yamaguchi e Ruoslahti, 1988; Vij et al., 2004). Regulariam a síntese de DNA durante a fase proliferativa tanto nas células epiteliais como nas estromais, onde ocorre a regeneração desse tecido no ciclo normal. É possível que a redução do ácido hialurônico seja um mecanismo compensatório para tentar frear a proliferação endometrial exagerada na SOP. Tal fato explicaria as alterações relacionadas à receptividade endometrial, como também o desenvolvimento de lesões proliferativas e neoplásicas.

O biglicam é um proteoglicano bem conhecido de matriz pericelular (Schaefer e Iozzo, 2008), que modula eventos de sinalização celular. Na sua forma solúvel, é capaz de ativar a proteína quinase ativada pelo mitógeno p38, a quinase regulada por sinal extracelular (Erk) e o fator kapa nuclear de cadeia leve ativador de células B (NF-kB) e, consequentemente, a secreção de TNF-α (Nastase et al., 2012). Estas substâncias são responsáveis pelo aumento da mitose e proliferação do tecido durante a fase proliferativa. Contudo, o incremento deste proteoglicano no endométrio de pacientes com SOP ainda não é bem claro. Atuaria, ao que parece, estimulando a proliferação endometrial, o que seria prejudicial à função endometrial.

Além dessas funções relatadas, os SLRPs regulam a fibrilogênese do colágeno. O decorim é considerado molécula reguladora, atrasando o espessamento das fibrilas de colágeno (Rada et al., 1993; Vogel e Trotter, 1987). Vogel e Trotter (1987) mostraram que o decorim, bem como o lumicam, *in vitro* estabilizariam as fibrilas finas. Ameye et al. (2002) mostraram que camundongas deficientes em fibromodulina sintetizam menos feixes de fibrilas colágenas, sendo frequentemente irregulares e com menor diâmetro, e os *knock-out* para o decorim apresentam fibrilas irregulares aumentadas de diâmetro.

Nossos resultados sugerem que, nas pacientes com SOP, haveria redução dos glicosaminoglicanos, em especial de AH. O AH de alto peso molecular é sintetizado pela HAS1, que apesar de se encontrar em maior concentração, acha-se inibida, ou mesmo pelo aumento das hialuronidases, quando há predomínio estrogênico, sem oposição da progesterona. Haveria, nessa situação, formação de uma matriz extracelular inadequada (pouco hidratada). Tal fato interferiria negativamente no processo de implantação embrionária. O ácido hialurônico de baixo peso molecular tem importante papel na via de sinalização celular, estando envolvido no processo de angiogênese, apoptose e motilidade celular. Desse modo, quando se encontra em níveis reduzidos, a atividade antiapoptótica estaria diminuída, favorecendo a proliferação celular. Por outro lado, observa-se maior expressão de decorim e lumicam no endométrio de pacientes com SOP. Estes SLRPs acham-se relacionados com o processo antiproliferativo local. Haveria, assim, um possível

mecanismo compensatório para reduzir a atividade antiapoptótica, além de diminuir a degradação do AH de alto peso molecular. Em síntese, esses achados poderiam interferir na receptividade endometrial.

6 Conclusões

1 - A concentração de glicosaminoglicanos sulfatados e de ácido hialurônico foi menor no endométrio de pacientes com SOP do que em mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual;

2 - O endométrio de mulheres com síndrome dos ovários policísticos apresentou maior concentração de HAS1 e de HAS2 e menor presença de HAS3 do que o de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual;

3 - Houve maior expressão de decorim e lumicam no endométrio de pacientes com SOP em comparação ao de mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual.

7 Anexos

A Comitê de ética

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 02/02/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0792/10**, intitulado: "**ANÁLISE DO ÁCIDO HIALURÔNICO E PROTEOGLICANOS RICOS EM LEUCINA NO ENDOMÉTRIO DE MULHERES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS E DE MULHERES EUMENORRÉICAS**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Pesquisador (a) Responsável: **Edmund Chada Baracat**
Pesquisador (a) Executante: **Ricardo dos Santos Simões**

CAPPesq, 03 de Fevereiro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

B Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (..... ..).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Análise de ácido hialurônico e proteoglicanos ricos em leucina no endométrio de mulheres com síndrome dos ovários policísticos e de mulheres eumenorréicas.

PESQUISADOR: Ricardo dos Santos Simões.

CARGO/FUNÇÃO: Pós-Graduando. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .117502

UNIDADE DO HC - FMUSP: Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO ☒
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 meses.

1 – Desenho do estudo e objetivo: Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa "estudar a matriz extracelular do endométrio (tecido interno do útero que desprende durante a menstruação) de mulheres com ovários policísticos, comparando-a com a de mulheres com menstruação regular".

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros neste estudo: Será realizada biópsia endometrial, ou seja, será coletada pequena amostra do material endometrial das voluntárias deste estudo.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: Será efetuada história com relato da saúde (com menstruação regular) ou doença (com ovários policísticos). Todas as mulheres participantes serão examinadas, incluindo avaliação (exame) ginecológica. Além disso, iremos coletar pequena quantidade de sangue 10 mL (três colheres de sopa) pela punção (retirada com agulha) da veia do antebraço. Nesta coleta, as participantes necessitam de ter jejum (não se alimentar ou beber água) nas 12 horas anteriores a retirada do sangue da veia para avaliar os seguintes exames que ajudam no diagnóstico de ovários policísticos ou que interferem com a sua saúde: hormônio estimulante da tireóide – TSH (controla a tireóide), tiroxina livre - T4L (quantidade que age no corpo do hormônio da tireóide), testosterona total (hormônio masculino), prolactina (hormônio que interfere com a ovulação), sulfato de dehidroepiandrosterona (hormônio masculino), 17- hidroxiprogesterona (substância que aumenta o hormônio masculino), hormônio gonadotrófico coriônico – betahCG (teste de gravidez), bem como glicemia (açúcar no sangue) e insulina (controla a quantidade de açúcar no sangue) de jejum. Todas as voluntárias serão submetidas também a ultrassonografia pélvica transvaginal. As pacientes selecionadas serão submetidas à biópsia endometrial (coleta de material da parte que desprende na menstruação) que será feita em sala de exame com o uso de cateter (pequeno tubo plástico ou metálico que aspira o tecido) endometrial do tipo Pipelle de Cornier (Cooper Surgical, Trumbull, CT, USA) ou Novak. Este material será essencial para avaliar as estruturas (ácido hialurônico e proteoglicanos ricos em leucina) que pode atuar na saúde endometrial (fertilidade ou desenvolvimento de lesões precursoras de câncer do endométrio).

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3.

A coleta de sangue pode proporcionar desconforto leve e, ocasionar risco mínino de pequenos hematomas (coleção de sangue abaixo da pele) ou ecmose (manchas arroxeadas na pele) que irão desaparecer com o tempo. A biópsia endometrial pode levar a desconforto de leve a moderado e pequeno risco de sangramento após o procedimento, bem como perfuração uterina que serão cuidados pelo médico que realizou o procedimento (Dr. Ricardo dos Santos Simões).

5 – Benefícios para o participante: Todas voluntárias terão garantido o atendimento no ambulatório ginecologia especializado em mulheres com ovários policísticos, bem como todas as informações sobre sua saúde que contempla este estudo, bem como o resultado de exames. Além disso, o resultado de estudo poderá proporcionar conhecimento para melhor entendimento dos ovários policísticos que irão beneficiar toda a população.

6 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Ricardo dos Santos Simões que pode ser encontrado no endereço Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Universidade de São Paulo, Telefone (11) 30697621. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre os aspectos éticos da pesquisa (estudo), entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

7 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

8 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente na publicação dos dados.

9 – Direito de ser mantida atualizada (informada) sobre os resultados parciais (exames) das pesquisas, quando em estudos abertos (tipo deste estudo), ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores durante as visitas médicas com o Dr Ricardo dos Santos Simões.

10 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Não há também compensação financeira relacionada à sua participação.

11 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas pela Instituição.

12 - Compromisso do pesquisador (Dr Ricardo dos Santos Simões) de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas pra mim, descrevendo o estudo. "Análise de ácido hialurônico e proteoglicanos ricos em leucina no endométrio de mulheres com síndrome dos ovários policísticos e de mulheres eumenorréicas"

Eu discuti com o Dr. Ricardo dos Santos Simões sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros pra mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data ____/_____/_____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data _____/_____/_____

8 Referências

Abaskharoun M, Bellemare M, Lau E, Margolis RU. Expression of hyaluronan and the hyaluronan-binding proteoglycans neurocan, aggrecan, and versican by neural stem cells and neural cells derived from embryonic stem cells. *Brain Res*. 2010; 1327:6-15.

Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*. 2006; 12(6):731-46.

Adamia S, Maxwell CA, Pilarski LM. Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005; 5(1):3-14.

Afify AM, Craig S, Paulino AF, Stern R. Expression of hyaluronic acid and its receptors, CD44s and CD44v6, in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. *Ann Diagn Pathol*. 2005; 9(6):312-8.

Afify AM, Craig S, Paulino AF. Temporal variation in the distribution of hyaluronic acid, CD44s, and CD44v6 in the human endometrium across the menstrual cycle. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006; 14(3):328-33.

Akram M, Roohi N. Endocrine correlates of polycystic ovary syndrome in Pakistani women. *Coll Physicians Surg Pak*. 2015; 25(1):22-6.

Ameye L, Aria D, Jepsen K, Oldberg A, Xu T, Young MF. Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. *FASEB J*. 2002; 16(7):673-80.

Apparao KBC, Lovely LP, Gui Y, Lininger RA, Lessey BA. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biol Reprod.* 2002; 66(2):297-304.

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 1990; 61(7):1303-13.

Aruffo A. CD44 one ligand 2 functions. *J Clin Invest*. 1996; 98(10):2191-2.

Avellaira C, Villavicencio A, Bacallao K, Gabler F, Wells P, Romero C, Vega M. Expression of molecules associated with tissue homeostasis in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2006; 21(12):3116-21.

Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF; Androgen Excess Society. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(11):4237-45.

Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF; Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen Excess and PCOS Society. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009; 91(2):456-88.

Azziz R, Marin C, Hoq L, Badamgarav E, Song P. Health care-related economic burden of the polycystic ovary syndrome during the reproductive life span. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(8):4650-8.

Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(6):2745-9.

Balazs E, Gibbs D. The rheological properties and the biological function of hyaluronic acid. In: Balazs EA. *Chemistry and Molecular Biology of Intercellular Matrix*. New York: Academic Press; 1970. p.431-7.

Banu J, Fatima P, Sultana P, Chowdhury MA, Begum N, Anwary SA, Ishrat S, Deeba F, Begum SA. Association of infertile patients having polycystic ovarian syndrome with recurrent miscarriage. *Mymensingh Med J*. 2014; 23(4):770-3.

Baracat MC, Serafini PC, Simões RS, Maciel GA, Soares Jr JM, Baracat EC. Systematic review of cell adhesion molecules and estrogen receptor expression

in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet.* 2015; 129(1):1-4.

Barbieri RL. Induction of ovulation in infertile women with hyperandrogenism and insulin resistance. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183(6):1412-8.

Barry JA, Azizia MM, Hardiman PJ. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2014; 20(5):748-58.

Batista JG, Soares-Jr JM, Maganhin CC, Simões RS, Tomaz G, Baracat EC. Assessing the benefits of rosiglitazone in women with polycystic ovary syndrome through its effects on insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor-binding protein-3 and insulin resistance: a pilot study. *Clinics (Sao Paulo).* 2012; 67(3):283-7.

Belsey EM, Pinol AP. Menstrual bleeding patterns in untreated women. Task Force on Long-Acting Systemic Agents for Fertility Regulation. *Contraception*. 1997; 55(2):57-65.

Bourdiec A, Akoum A. Embryo implantation: role of interleukin 1 family members. *Med Sci (Paris).* 2014; 30(6-7):644-50.

Brinck J, Heldin P. Expression of recombinant hyaluronan synthase (HAS) isoforms in CHO cells reduces cell migration and cell surface CD44. *Experimental Cell Research.* 1999; 252(2):342-51.

Burghardt RC, Johnson GA, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Spencer TE, Bazer FW. Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells Tissues Organs.* 2002; 172(3):202-17.

Chakraborty S, Khurana N, Sharma JB, Chaturvedi KU. Endometrial hormone receptors in women with dysfunctional uterine bleeding. *Arch Gynecol Obstet*. 2005; 272(1):17-22.

Chen S, Birk DE. The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly. *FEBS J.* 2013; 280(10):2120-37.

Chen S, Oldberg A, Chakravarti S, Birk DE. Fibromodulin regulates collagen fibrillogenesis during peripheral corneal development. *Dev Dyn.* 2010; 239(3):844-54.

Cheung AP. Ultrasound and menstrual history in predicting endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol*. 2001; 98(2):325-31.

Chittenden BG, Fullerton G, Maheshwari A, Bhattacharya S. Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review. *Reprod Biomed Online.* 2009; 19(3):398-405.

Cloke B, Christian M. The role of androgens and the androgen receptor in cycling endometrium. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 358(2):166-75.

Cordo-Russo R, Garcia MG, Barrientos G, Orsal AS, Viola M, Moschansky P, Ringel F, Passi A, Alaniz L, Hajos S, Blois SM. Murine abortion is associated with enhanced hyaluronan expression and abnormal localization at the feto maternal interface. *Placenta*. 2009; 30(1):88-95.

Deed R, Rooney P, Kumar P, Norton JD, Freemont AJ, Kumar S. Early-response gene signaling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *Int J Cancer.* 1997; 71(2):251-6.

Dietrich CP, Dietrich SMC. Eletrophoretic behaviour of acid mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem*. 1976; 70(2):645-7.

Dietrich CP, Nader HB, Straus AH. Structural differences of heparan sulfates according to tissue and species of origin*. Biochem Biophys Res Commun*. 1983; 111(3):865-71.

Dietrich CP, Nader HB. Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissue. Isolation and partial characterization of a hemogeneous species of heparitin sulfate. *Biochim Biophys Acta.* 1974; 343(1):34-44.

Dietrich CP. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Braz J Med Biol Res.* 1984;17(1):5-15.

Donaghay M, Lessey BA. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med*. 2007; 25(6):461-75.

Dreyfuss JL, Regatieri CV, Jarrouge TR, Cavalheiro RP, Sampaio LO, Nader HB. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc*. 2009; 81(3):409-29.

Ehrmann DA, Rychlik D. Pharmacologic treatment of polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med*. 2003; 21(3):277-83.

Esko JD. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr Opin Cell Biol.* 1991; 3(5):805-6.

Fehring RJ, Schneider M, Raviele K. Variability in the phases of the menstrual cycle. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2006; 35(3):376-84.

Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1961; 21:1440-7.

Fornes R, Ormazabal P, Rosas C, Gabler F, Vantman D, Romero C, Vega M. Changes in the expression of insulin signaling pathway molecules in endometria from polycystic ovary syndrome women with or without hyperinsulinemia. *Mol Med*. 2010; 16(3-4):129-36.

França Neto AH, Rogatto S, Do Amorim MM, Tamanaha S, Aoki T, Aldrighi JM. Oncological repercussions of polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2010; 26(10):708-11.

Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome*. Hum Reprod Update*. 2008; 14(4):367-78.

Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997; 242(1):27-33.

Freudenberger T, Röck K, Dai G, Dorn S, Mayer P, Heim HK, Fischer JW. Estradiol inhibits hyaluronic acid synthase 1 expression in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*. 2011; 106(6):1099-109.

Gall Y. Hyaluronic acid: structure, metabolism and implication in cicatrisation. *Ann Dermatol Venereol*. 2010; 137(Suppl.1):S30-9.

Gallagher JT. The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone. Curr Opin Cell Biol. 1989;1(6):1201-18.

Garry R, Hart R, Karthigasu KA, Burke C. Structural changes in endometrial basal glands during menstruation. *BJOG*. 2010; 17(10):1175-85.

Giordano MV, Giordano LA, Gomes RC, Simões RS, Nader HB, Giordano MG, Baracat EC, Soares Júnior JM. The evaluation of endometrial sulfate glycosaminoglycans in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2015; 31(4):278-81.

Giudice LC. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006; 20(2):235-44.

Glueck CJ, Phillips H, Cameron D, Sieve-Smith L, Wang P. Continuing metformin through pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: a pilot study. *Fertil Steril*. 2001; 75(1):46-52.

Gomes RC, Maioral GCCC, Verna C, Patriarca, MT, Nader HB, Simões RS, Baracat EC, Soares JM Jr. Hyperprolactinemia changes the sulfated glycosaminoglycan amount on the murine uterus during the estrous cycle. *Fertil Steril*. 2013; 100(5):1419-27.

Gomes RC, Simões RS, Soares Jr JM, Nader HB, Simões M de J, Baracat EC. Profile of sulphated glycosaminoglycans content in the murine uterus during the different phases of the estrous cycle. *Rev Assoc Med Bras*. 2007; 53(3):261-6.

Halper J. Proteoglycans and diseases of soft tissues. *Adv Exp Med Biol*. 2014;802:49-58.

Haoula Z, Salman M, Atiomo W. Evaluating the association between endometrial cancer and polycystic ovary syndrome. Hum Reprod. 2012; 27(5):1327-31.

Hascall VC, Majors AK, De La Motte CA, Evanko SP, Wang A, Drazba JA, Strong SA, Wight TN. Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1673(1-2):3-12.

Hascall VC, Wang A, Tammi M, Oikari S, Tammi R, Passi A, Vigetti D, Hanson RW, Hart GW. The dynamic metabolism of hyaluronan regulates the cytosolic concentration of UDP-GlcNAc. *Matrix Biol*. 2014; 35:14-7.

Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D. Hirsutism implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol*. 1981; 140(7):815-30.

Heldin P. Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36(8):967-73.

Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol*. 1998; 17(1):1-19.

Huang A, Brennan K, Azziz R. Prevalence of hyperandrogenemia in the polycystic ovary syndrome diagnosed by the National Institutes of Health 1990 criteria. *Fertil Steril.* 2010; 93(6):1938-41.

Iozzo RV, Cohen I. Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma. *EXS*. 1994; 70:199-214.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. Annu *Rev Biochem*. 1998;67:609-52.

Iozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem*. 1999; 274(27):18843-6.

Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem*. 1999; 274(35):25085-92.

Itano N. Simple primary structure, complex turnover regulation and multiple roles of hyaluronan. *J Biochem*. 2008; 144(2):131-7.

Ito K, Suzuki T, Akahira J, Moriya T, Kaneko C, Utsunomiya H, Yaegashi N, Okamura K, Sasano H. Expression of androgen receptor and 5alpha-reductases in the human normal endometrium and its disorders. *Int J Cancer*. 2002; 99(5):652-7.

Jacobson A, Brinck J, Briskin MJ, Spicer AP, Heldin P. Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochem J*. 2000; 348(Pt 1):29-35.

Jaques LB, Ballieux RE, Dietrich CP, Kavanagh LW. A microelectrophoresis method for heparin. *Can J Physiol Pharmacol*. 1968; 46(3):351-60.

Jayakrishnan K, Anupama R, Koshy A, Raju R. Endometrial carcinoma in a young subfertile woman with polycystic ovarian syndrome. *J Hum Reprod Sci*. 2010; 3(1):38-41.

Jonard S, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Pigny P, Decanter C, D Dewailly. Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? *Hum Reprod*. 2003; 18(3):593-603.

Kimura T, Yamaoka T, Iwase R, Murakami A. Effect of serine residue on the effectiveness of cationic polypeptide-based gene delivery. *Nucleic Acids Symp Ser.* 2000;(44):299-300.

Kirn-Safran CB, D'Souza SS, Carson DD. Heparan sulfate proteoglycans and their binding proteins in embryo implantation and placentation. *Semin Cell Dev Biol*. 2008; 19(2):187-93.

Kitaya K, Yasuo T. Dermatan sulfate proteoglycan biglycan as a potential selectin L/CD44 ligand involved in selective recruitment of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium. *J Leukoc Biol*. 2009; 85(3):391-400.

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.

Kodaman PH, Taylor HS. Hormonal regulation of implantation. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2004; 31(4):745-66.

Kohan K, Carvajal R, Gabler F, Vantman D, Romero C, Vega M. Role of the transcriptional factors FOXO1 and PPARG on gene expression of SLC2A4 in endometrial tissue from women with polycystic ovary syndrome. *Reproduction*. 2010; 140(1):123-31.

Kuznetsova AV, Paukov VS, Voloshchuk IN, Demidova EM. Changes in the components of the extracellular matrix and its regulators in the endometrium of women with habitual abortion. *Arkh Patol*. 2002; 64(1):18-22.

Lebl MD, Martins JR, Nader HB, Simões Mde J, De Biase N. Concentration and distribution of hyaluronic acid in human vocal folds. *Laryngoscope*. 2007; 117(4):595-9.

Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol*. 2000; 12(5):581-6.

Lessey BA, Young SL. Homeostasis imbalance in the endometrium of women with implantation defects: the role of estrogen and progesterone. *Semin Reprod Med*. 2014; 32(5):365-75.

Li HW, Lee VC, Lau EY, Yeung WS, Ho PC, Ng EH. Cumulative live-birth rate in women with polycystic ovary syndrome or isolated polycystic ovaries undergoing in-vitro fertilisation treatment. *J Assist Reprod Genet*. 2014; 31(2):205-11.

Lockwood CJ. Mechanisms of normal and abnormal endometrial bleeding. *Menopause*. 2011; 18(4):408-11.

Lombardi LA, Simões RS, Maganhin CC, Baracat MCP, Silva-Sasso, GR; Florencio-Silva R; Soares-Jr JM, Baracat EC. Avaliação imunoistoquímica da proliferação, apoptose e de enzimas esteroidogênicas no ovário de ratas com ovários policísticos. *Rev Assoc Med Bras*. 2014; 60(4):349-56.

Lombardi LA, Simões RS, Maganhin CC, da Silva CF, Maciel GA, Baracat EC, Soares JM Jr. Morphology of the interstitial cells of rat polycystic ovaries: an experimental study. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012; 34(7):323-8.

Lopes CC, Dietrich CP, Nader HB. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(2):157-67.

Lopes IM, Maganhin CC, Oliveira-Filho RM, Simões RS, Simões MJ, Iwata MC, Baracat EC, Soares JM Jr. Histomorphometric Analysis and Markers of Endometrial Receptivity Embryonic Implantation in Women With Polycystic Ovary Syndrome During the Treatment With Progesterone. *Reprod Sci.* 2014; 21(7):930-938.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265-75.

Lucariello A, Trabucco E, Boccia O, Perna A, Sellitto C, Castaldi MA, De Falco M, De Luca A, Cobellis L. Small leucine rich proteoglycans are differently

distributed in normal and pathological endometrium. *In Vivo*. 2015 ;29(2):217-22.

Maganhin CC, Fuchs LF, Simões RS, Oliveira-Filho RM, de Jesus Simões M, Baracat EC, Soares JM Jr. Effects of melatonin on ovarian follicles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013; 166(2):178-84.

Manzini JL. Declaración de Helsinki: principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos. *Acta Bioeth*. 2000; 6(2):321-34.

Marei WF, Salavati M, Fouladi-Nashta AA. Critical role of hyaluronidase-2 during preimplantation embryo development. *Mol Hum Reprod*. 2013; 19(9):590-9.

Martins JR, Passerotti CC, Maciel RM, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem*. 2003; 319(1):65-72.

McDonald JA, Camenisch TD. Hyaluronan: genetic insights into the complex biology of a simple polysaccharide. *Glycoconj J*. 2002; 19(4-5):331-9.

Mertens HJ, Heineman MJ, Koudstaal J, Theunissen P, Evers JL. Androgen receptor content in human endometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996; 70(1):11-3.

Nasciutti LE, Ferrari R, Berardo PT, Souza ML, Takiya CM, Borojevic R, Abrão MS, Silva LC. Distribution of chondroitin sulfate in human endometrium. *Micron*. 2006; 37(6):544-50.

Nastase MV, Jovem MF, Schaefer L. Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *J Histochem Cytochem*. 2012; 60(12):963-75.

Noe M, Kunz G, Herbertz M, Mall G, Leyendecker G. The cyclic pattern of the immunocytochemical expression of oestrogen and progesterone receptors in human myometrial and endometrial layers: characterization of the endometrial-subendometrial unit. *Hum Reprod*. 1999; 14(1):190-7.

Noyes RW, Hertig AT, Rock JR. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* 1975; 122(2):262-3.

Nusgens BV. Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule? *Ann Dermatol Venereol*. 2010; 137(Suppl.1):S3-8.

Okon MA, Laird SM, Tuckerman EM, Li TC. Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertil Steril*. 1998; 69(4):682-90.

Orian-Rousseau V, Sleeman J. CD44 is a multidomain signaling platform that integrates extracellular matrix cues with growth factor and cytokine signals. *Adv Cancer Res.* 2014; 123:231-54.

Pan JX, Liu Y, Ke ZH, Zhou CL, Meng Q, Ding GL, Xu GF, Sheng JZ, Huang HF. Successive and cyclic oral contraceptive pill pretreatment improves IVF/ICSI outcomes of PCOS patients and ameliorates hyperandrogenism and antral follicle excess. *Gynecol Endocrinol*. 2015; 31(4):332-6.

Panzan MQ, Mattar R, Maganhin CC, Simões Rdos S, Rossi AG, Motta EL, Baracat EC, Soares JM Jr. Evaluation of FAS and caspase-3 in the endometrial tissue of patients with idiopathic infertility and recurrent pregnancy loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013; 167(1):47-52.

Papaioannou S, Tzafettas J. Anovulation with or without PCO, hyper androgenaemia and hyperinsulinaemia as promoters of endometrial and breast cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2010; 24(1):19-27.

Prapas N, Karkanaki A, Prapas I, Kalogiannidis I, Katsikis I, Panidis D. Genetics of polycystic ovary syndrome. *Hippokratia*. 2009; 13(4):216-23.

Prata Lima MF, Baracat EC, Simões MJ. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(7):987-95.

Qiao J, Wang L, Li R, Zhang X. Microarray evaluation of endometrial receptivity in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2008; 17(3):425-35.

Rada JA, Cornuet PK, Hassell JR. Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. *Exp Eye Res*. 1993; 56(6):635-48.

Raheem KA, Marei WF, Mifsud K, Khalid M, Wathes DC, Fouladi-Nashta AA. Regulation of the hyaluronan system in ovine endometrium by ovarian steroids. *Reproduction*. 2013; 145(5):491-504.

Riddle ND, Gorden L, Rojiani MV, Hakam A, Rojiani AM. CD44 and p53 immunoexpression patterns in NF1 neoplasms-indicators of malignancy and infiltration. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010; 3(5):515-21.

Rosenfield RL. Pilosebaseous physiology in relation to hirsutism and acne. *Clin Endocrinol Metab*. 1986; 15(2):341-62.

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*. 2004; 19(1):41-4.

Rydell-Törmänen K, Andréasson K, Hesselstrand R, Westergren-Thorsson G. Absence of fibromodulin affects matrix composition, collagen deposition and cell turnover in healthy and fibrotic lung parenchyma. *Sci Rep*. 2014; 4:6383.

Salamonsen LA, Shuster S, Stern R. Distribution of hyaluronan in human endometrium across the menstrual cycle. Implications for implantation and menstruation. *Cell Tissue Res*. 2001; 306(2):335-40.

Salgado RM, Favaro RR, Martin SS, Zorn TM. The estrous cycle modulates small leucine-rich proteoglycans expression in mouse uterine tissues. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009; 292(1):138-53.

Salgado RM, Favaro RR, Zorn TM. Modulation of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) expression in the mouse uterus by estradiol and progesterone. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011; 9:22.

Sampaio LO, Tersariol IL, Lopes CC, Bouças RI, Nascimento FD, Rocha HA, Nader HB. Heparins and heparan sulfates. Structure, distribution and protein interactions. Insights into carbohydrate structure and biological function. In: Verli H. Editor. *Carbohydrate structure and biological function*. Kerala: Transworld Research Network, 2006, p. 1-24.

San Martin S, Soto-Suazo M, Ferreira de Oliveira S, Aplin JD, Abrahamsohn P, Zorn TMT. Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice. *Reproduction*. 2003; 125(4):585-95.

Schaefer L, Iozzo RV. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem*. 2008; 283(31):21305-9.

Schulz T, Schumacher U, Prehm P. Hyaluronan export by the ABC transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP. *J Biol Chem*. 2007; 282(29):20999-1004.

Schuster J, Karlsson T, Karlström PO, Poromaa IS, Dahl N. Down-regulation of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in peripheral nucleated blood cells associated with premature ovarian failure (POF) and polycystic ovary syndrome (PCOS). *Reprod Biol Endocrinol*. 2010; 8:58.

Serafini PC. *Expressão protéica no endométrio durante a fase lútea do ciclo menstrual* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Shah B, Parnell L, Milla S, Kessler M, David R. Endometrial thickness, uterine, and ovarian ultrasonographic features in adolescents with polycystic ovarian syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2010; 23(3):146-52.

Shang K, Jia X, Qiao J, Kang J, Guan Y. Endometrial abnormality in women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci*. 2012; 19(7):674-83.

Silva BB, Rocha Gontijo JA, Crété AR, de Jesus Simões M. Evaluation of body weight in androgenized female rats. Clin Exp Obstet Gynecol. 2002; 29(2):97-9.

Simões RS, Baracat MCP, Maciel GAR, Soares JM, Baracat EC. How is the endometrial apoptosis/proliferation balance in the polycystic ovary syndrome (PCOS) during proliferative phase? *Giorn It Ost Gin*. 2013; 35(1):335-9.

Simões RS, Oliveira-Filho RM, Nader HB, Baracat EC. Glycosaminoglycan profiles in the uterus of adult ovariectomized rats treated with estrogen and progestagen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012; 165(2):265-70.

Singh KB. Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. *Fertil Steril*. 2005; 84(Suppl2):1228-34.

Soto-Suazo M, Abrahamsohn PA, Pereda J, San Martin S, Nader HB, Sampaio LO, Zorn TT. Modulation of hyaluronan in the migratory pathway of mouse primordial germ cells. *Histochem Cell Biol*. 2002; 117(3):265-73.

Spicer AP, McDonald JA. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem*. 1998; 273(4):1923-32.

Spicer AP, Tien JY. Hyaluronan and morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004; 72(1):89-108.

Stein I, Leventhal M. Amenorrhoea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1935; 29:181-5.

Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol.* 2006; 85(8):699-715.

Takemura M, Itoh H, Sagawa N, Yura S, Korita D, Kakui K, Kawamura M, Hirota N, Maeda H, Fujii S. Cyclic mechanical stretch augments hyaluronan production in cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod*. 2005; 11(9):659-65.

Tamimi W, Siddiqui IA, Tamim H, Aleisa N, Adham M. Effect of body mass index on clinical manifestations in patients with polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009; 107(1):54-7.

Tanaka T, Wang C, Umesaki N. Remodeling of the human endometrial epithelium is regulated by laminin and type IV collagen. *Int J Mol Med*. 2009; 23(2):173-80.

Teixeira Gomes RC, Verna C, Nader HB, dos Santos Simões R, Dreyfuss JL, Martins JR, Baracat EC, de Jesus Simões M, Soares JM Jr. Concentration and distribution of hyaluronic acid in mouse uterus throughout the estrous cycle. *Fertil Steril.* 2009; 92(2):785-92.

Tokmak A, Kokanali MK, Guzel AI, Kara A, Topcu HO, Cavkaytar S. Polycystic ovary syndrome and risk of endometrial cancer: a mini-review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(17):7011-4.

Törrönen K, Nikunen K, Kärnä R, Tammi M, Tammi R, Rilla K. Tissue distribution and subcellular localization of hyaluronan synthase isoenzymes. *Histochem Cell Biol*. 2014; 141(1):17-31.

Uchiyama T, Sakuta T, Kanayama T. Regulation of hyaluronan synthases in mouse uterine cervix. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 327(3):927-32.

Vabres P. Hyaluronan, embryogenesis and morphogenesis. *Ann Dermatol Venereol*. 2010; 137(Suppl.1):9-14.

Vause TD, Cheung AP, Sierra S, Claman P, Graham J, Guillemin JA, Lapensée L, Steward S, Wong BC; Society of Obstetricians and Gynecologists of Canada. Ovulation induction in polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol Can*. 2010; 32(5):495-502.

Vélez LM, Motta AB. Association between polycystic ovary syndrome and metabolic syndrome. *Curr Med Chem*. 2014; 21(35):3999-4012.

Vigetti D, Passi A. Hyaluronan synthases posttranslational regulation in cancer. *Adv Cancer Res*. 2014; 123:95-119.

Vigetti D, Viola M, Karousou E, De Luca G, Passi A. Metabolic control of hyaluronan synthases. *Matrix Biol*. 2014; 35:8-13.

Vij N, Roberts L, Joyce S, Chakravarti S. Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas - Fas ligand mediated apoptosis: implications in the cornea. *Exp Eye Res*. 2004; 78(5):957-71.

Vogel KG, Trotter JA. The effect of proteoglycan on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Coll Relat Res*. 1987; 7(2):105-14.

Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 2004; 27(6):1487-95.

Wang A, Ji L, Shang W, Li M, Chen L, White RE, Han G. Expression of GPR30, ERα and ERβ in endometrium during window of implantation in patients with

polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Gynecol Endocrinol*. 2011; 27(4):251-5.

Wang JX, Davies MJ, Norman RJ. Polycystic ovarian syndrome and the risk of spontaneous abortion following assisted reproductive technology treatment. *Hum Reprod.* 2001; 16(12):2606-9.

Weigel PH, DeAngelis PL. Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases. *J Biol Chem*. 2007; 282(51):36777-81.

Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem.* 1997; 272(221):13997-4000.

Weyne GRS. Determinação do tamanho da amostra em pesquisas experimentais na área da saúde. *Arq Med ABC*. 2004; 29:87-90.

Yamaguchi Y, Ruoslahti E. Expression of human proteoglycan in Chinese hamster ovary cells inhibits cell proliferation. *Nature*. 1988; 336(6196):244-6.

Yasuo T, Yamaguchi T, Kitaya K. Progesterone induction of chondroitin sulfate proteoglycan aggrecan expression in human endometrial epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 122(4):159-63.

Yoshida M, Itano N, Yamada Y, Kimata K. In vitro synthesis of hyaluronan by a single protein derived from mouse HAS1 gene and characterization of amino acid residues essential for the activity. *J Biol Chem*. 2000; 275(1):497–506.

Young SL, Lessey BA. Progesterone function in human endometrium: clinical perspectives. *Semin Reprod Med*. 2010; 28(1):5-16.

Zabuliene L, Tutkuviene J. Body composition and polycystic ovary syndrome. *Medicina (Kaunas).* 2010; 46(2):142-57.

Zorn TM, Pinhal MA, Nader HB, Carvalho JJ, Abrahamsohn PA, Dietrich CP. Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1995; 41(1):97-106.