

Avaliação morfológica e molecular de componentes fibrilares da matriz extracelular da cérvix e vagina de camundongos primíparos e múltiparos senescentes durante a prenhez.

Gabriela Aparecida da Silva^{[1]*}, Lizandra Maia de Sousa [2], Paula Andrea Saenz Suarez [2], Maria Helena Baena de Moraes Lopes [1], Sílvio Roberto Consonni [2].

Unidade/Instituição: Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia

1. Faculdade de Enfermagem (FENF) - UNICAMP

2. Instituto de Biologia (IB) - UNICAMP

Resumo: O estroma da cérvix e da vagina são compostos por uma matriz extracelular (MEC) abundante em fibras colágenas e elásticas que, associadas a outros componentes, têm papel fundamental na sustentação da gestação e no parto, a fim impedir o trabalho de parto prematuro e prevenir o prolapso de órgãos pélvicos. As alterações na morfologia pélvica feminina consequentes da senescência e da multiparidade impactam a remodelação dos tecidos, alterando sua biomecânica. O presente estudo buscou avaliar evidências morfológicas de alterações nas fibras colágenas e elásticas presentes na cérvix e na vagina em camundongos fêmeas primíparos e múltiparos senescentes durante a prenhez a fim de compreender bases para o estudo da fisiopatologia do prolapso de órgãos pélvicos (POP) e do parto prematuro. Como resultados preliminares, este trabalho demonstrou as remodelações teciduais durante a prenhez de animais primíparos e múltiparos. Nossos achados sugerem que os tecidos da cérvix e da vagina de camundongos múltiparos remodelam, mas aparentemente não se recuperam totalmente das alterações após sucessivas gestações, o que pode refletir em alterações biomecânicas, predispondo o POP e o parto prematuro.

Palavras-chave: canal de parto, multiparidade, colágeno, fibras elásticas.

Introdução

O parto envolve processos biológicos de remodelação tecidual e alteração dos componentes de MEC, ordenados e cuidadosamente cronometrados por meio de eventos no colo do útero (cérvix) e na vagina que culminam no nascimento do feto. Os processos de remodelação, durante a gestação e o parto, refletem em adaptações dramáticas do canal do parto e no assoalho pélvico para permitir uma distensão acentuada, seguida de um rápido retorno a um estado pré-gestacional. No entanto, numerosos estudos epidemiológicos sugerem que muitas mulheres não conseguem se recuperar completamente desse evento. E, de fato, o trauma na distensão dos órgãos do canal do parto parece desempenhar um papel importante na causa do prolapso de órgãos pélvicos (POP) [1,2].

Em roedores, o canal de parto mole envolve a cérvix e a vagina, que são compostas por colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos, ácido hialurônico, células musculares lisas, nervos, fibroblastos e um revestimento de tecido epitelial. Durante a prenhez, ocorrem alterações nas propriedades biomecânicas e na rigidez dos tecidos tal como o amolecimento da cérvix, que aumenta sua complacência, e a capacidade da vagina de se distender e, ao mesmo tempo, manter-se resistente às forças exercidas [1,2]. As alterações na complacência, isto é, a capacidade de estiramento sem sua ruptura, são facilitadas por mudanças na MEC – em humanos e em modelos animais. Durante a prenhez, a estrutura rígida e fechada da cérvix uterina sofre modificações extensas para permitir o sucesso do parto [3]. Essas alterações são

conhecidas como remodelação cervical, sendo um processo dividido em quatro fases sobrepostas, denominadas de: amolecimento (fase 1), amadurecimento (fase 2), dilatação (fase 3) e reparo pós-parto (fase 4), em que cada fase da remodelação é orquestrada em um ambiente endócrino único, modificando a função de células epiteliais, estromais, imunes e endoteliais, bem como a composição e estrutura da MEC [4,5]. Na vagina, durante a prenhez, o epitélio se altera significativamente, juntamente com a organização e a quantidade de fibras elásticas e colágenas, por meio de respostas endócrinas e variações na expressão de genes que sintetizam a MEC. Alterações nos arranjos das ligações cruzadas de colágeno, na densidade das fibras elásticas, e na quantidade de compostos fibrilares são considerados responsáveis pela remodelação da cérvix e da vagina [6,7]. Os efeitos da multiparidade na composição das fibras elásticas e colágenas da MEC da cérvix e da vagina, e sua relação com o enfraquecimento do tecido envolvem processos complexos e ainda poucos compreendidos [8]. A detecção aprimorada dessas alterações durante a remodelação tanto da cérvix como da vagina, na gravidez, pode, portanto, facilitar a compreensão da sua função biomecânica, bem como permitir o desenvolvimento de novos diagnósticos e intervenções para o parto prematuro e o POP [9]. Utilizamos, neste projeto, camundongos múltiparos e senescentes provenientes da matriz reprodutiva para a compreensão da remodelação dos tecidos conjuntivos na fisiopatologia da reprodução. O camundongo pode fornecer bases para

compreensão dos eventos de remodelação da MEC de mulheres durante a gestação, devido à semelhança dos processos, e vantagens tal como o curto tempo de prenhez e a possibilidade de se obter modelos geneticamente modificados, fornecendo detalhes sobre o remodelamento tecidual. Portanto, esse trabalho teve por objetivo a investigação das alterações histológicas dos compostos fibrilares presentes na cérvix e na vagina de camundongos fêmeas múltiparas senescentes comparados às primíparas jovens durante a primeira gestação, a fim de fornecer bases para entender as alterações morfológicas que podem justificar o parto prematuro ou o POP [8,9].

Metodologia

1. Animais: Camundongos fêmeas virgens C57BL/6J jovens (três meses de idade) com massa corporal de 25-30g e fêmeas constituintes da matriz reprodutiva (mínimo 5 partos) com aproximadamente 8 meses de idade, massa corporal de aproximadamente 40g. Os camundongos foram mantidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sob ciclo de 12 horas de luz e de escuro e tiveram livre acesso à comida padrão e à água. As fêmeas virgens jovens se constituíram no grupo de primíparas enquanto as fêmeas de matrizes reprodutoras se constituíram no grupo de múltiparas senescentes. A oportunidade de acasalamento foi providenciada a ambos os grupos e o dia, no qual o “plug” vaginal foi encontrado, tornou-se o 1º dia da gestação (D1). O nascimento foi esperado para o 19º dia. A cérvix uterina e a vagina foram obtidas de ambos os grupos, em animais não prenhes (D0), e no 6º dia (D6), D12, D15 e D18 de prenhez.

Tabela 1: Grupos amostrais. Total de animais no projeto: 30 camundongos fêmeas e 10 machos para acasalamento (5 por semestre). ML = microscopia de luz.

Grupos	D0	D6	D12	D15	D18
Primíparas	3 ML	3 ML	3 ML	3 ML	3 ML
Múltiparas	3 ML	3 ML	3 ML	3 ML	3 ML

2. Microscopia de luz: Amostras de cérvix uterina e de vagina de fêmeas primíparas e múltiparas senescentes foram fixadas por imersão em paraformaldeído 4% (Merck, Darmstadt, Germany) em solução-tampão de fosfato salino 0,1M (PBS, pH 7,4), durante 24h a 4°C . Em seguida, foram desidratados em bateria de álcoois, diafanizados em xilol e embebidos em parafina (Paraplast Kit embedding, Sigma, St Louis, MO, EUA) a 58°C . Cortes de $5 \mu\text{m}$ foram corados pelos métodos de *Tricrômico de Masson* (Kiernan, 1999), *Resorcina e Fucsina sem oxidação* e *Sirius Red* (Montes, 1996). Os materiais foram documentados em fotomicroscópio Eclipse 800 (Nikon, Japan), utilizando-se câmera digital P6FL PRO (Optika, Itália) e software OPTIKA PROVIEW.

3. Análise morfométrica: As fotomicrografias capturadas em objetivas de 2x para registro de todo o lúmen presente na cérvix e na vagina. O programa Optika Proview vem sendo utilizado para mensurar os lúmens dos órgãos e determinar sua área em milímetros quadrados. Essa quantificação está em andamento e serão apresentados aqui, resultados parciais.

Resultados e discussão

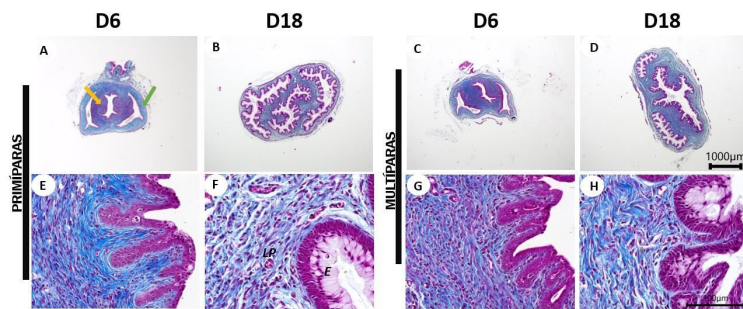


FIGURA 1: Fotomicrografias representativas da secção transversal da cérvix de camundongos fêmeas primíparas e múltiparas, em D6 e D18, coradas com Tricrômico de Masson, na objetiva de 2x (A, B, C, D) e 40x (E, F, G, H). Epitélio (E). Lâmina própria (LP). Observe, em pequeno aumento, o lúmen da endocérvice indicada pela seta amarela, e a exocérvice indicada pela seta verde em A. No maior aumento, veja no detalhe, a remodelação decorrente da gestação no tecido epitelial (E) que reveste a endocérvice e a composição fibrilar da lâmina própria (LP) formada essencialmente por tecido conjuntivo. Barra de escala D = 1000 μm e H = 100 μm .

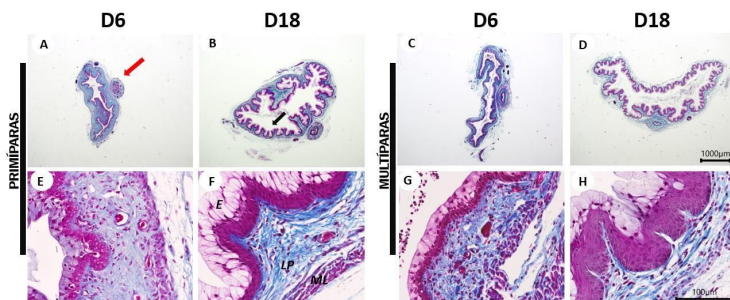


FIGURA 2: Fotomicrografias representativas da secção transversal da vagina de camundongos fêmeas primíparas e múltiparas em D6 e D18, coradas com Tricrômico de Masson na objetiva de 2x (A, B, C, D) e 40x (E, F, G, H). Epitélio (E). Lâmina própria (LP). Observe, no menor aumento, a uretra lateralmente indicada pela seta vermelha em A, as projeções da parede vaginal, indicada pela seta preta, em direção ao lúmen, em B. Observe, no maior aumento, a remodelação do tecido epitelial (E) e a composição da lâmina própria e seus componentes fibrilares. Barra de escala D = 1000 μm e H = 100 μm .

Durante a prenhez, os tecidos da cérvix e da vagina se alteram significativamente. Na cérvix, o D6 caracteriza-se pelo início da fase de amolecimento, onde espera-se encontrar um epitélio estratificado secretor com pouca diferenciação, um tecido conjuntivo mais compacto e com pouca substância fundamental formando o estroma, uma maior organização das fibras colágenas e elásticas na lâmina própria, alinhadas longitudinalmente. Já, no último dia da prenhez, em D18, a cérvix se encontra na fase de amadurecimento, espera-se encontrar nessa fase um epitélio secretor com grande diferenciação celular, fibras

colágenas menos reticuladas, mais espessas e fibras na quantidade de fibras elásticas em relação às primíparas elásticas curtas com pouca direcionalidade na lâmina [7, 8, 9].

própria [9, 10, 11]. Em relação a remodelação do tecido conjuntivo e epitelial da vagina, espera-se encontrar no início da prenhez uma parede espessa com um epitélio estratificado pouco secretor, uma lâmina própria densa, com fibras colágenas compactadas e fibras elásticas alinhadas. E ao final da prenhez, em D18, espera-se encontrar um lúmen maior, um epitélio mais estratificado e mais secretor, além da menor compactação do tecido conjuntivo, aumento no teor de fibras elásticas, e diminuição das ligações cruzadas entre as fibras de colágeno, corroborando a menor compactação tecidual. Ilustramos aqui os resultados obtidos, comparando-se D6 e D18, apenas. Os resultados morfológicos obtidos através da coloração da cérvice com Tricrômico de Masson (Fig.1) demonstram as alterações no tecido epitelial e na compactação e na organização dos componentes fibrilares. No início da prenhez, tanto em cérvice de primíparas quanto de múltíparas, observa-se (Fig.1 A e E, C e G), um epitélio estratificado colunar pouco secretor, e um tecido fibromuscular formado por conjuntivo denso com fibras colágenas compactadas e fibras musculares lisas, orientadas ao redor do lúmen da endocérvice. Já em D18 (Fig.1 B e D, F e H) nota-se um epitélio bastante secretor, e logo abaixo um tecido conjuntivo frouxamente organizado, com um maior espaçamento entre as fibras colágenas. Os resultados encontrados são compatíveis com estudos sobre o processo de amolecimento e amadurecimento da cérvice de camundongos [10, 11], os quais indicam que tanto as primíparas quanto as múltíparas senescentes apresentam remodelação tecidual durante a gestação.

Na Figura 2 observa-se os resultados das alterações morfológicas na vagina, corada com Tricrômico de Masson. Visualiza-se tanto em primíparas quanto em múltíparas em D6, no menor (Fig.2 A, C) e maior aumento (Fig.2 E, G), respectivamente, um lúmen central com projeções da parede vaginal, o epitélio estratificado secretor, o tecido conjuntivo com fibras colágenas compactadas e, logo abaixo da mucosa uma camada de músculo liso. Já em D18, observa-se no menor (Fig.2 B e D) e no maior aumento (Fig.2 F e H), o aparente aumento do lúmen central da vagina, das projeções da mucosa, da função secretora do epitélio e da quantidade de células na estratificação, além da aparente descompactação do tecido conjuntivo e aumento de substância amorfa. Comparando-se as múltíparas (Fig.2 C, D, G e H) às primíparas (Fig.2 A, B, E e F) no menor e no maior aumento, observa-se uma aparente diminuição da espessura total da parede da vagina e da camada de músculo liso, além de ser possível observar um epitélio qualitativamente mais espesso. Nossos resultados prévios corroboram com estudos realizados na parede vaginal de ovelhas, os quais sugerem que na vagina de múltíparas ocorre uma diminuição da camada muscular abaixo da lâmina própria e o aumento na espessura total do epitélio e

Observando os resultados da histoarquitetura obtidos através da polarização da cérvice, corada com Sirius Red, nota-se, em D6, tanto em primíparas (Fig.3 A, B, E, F) quanto em múltíparas (Fig.3 C, D, G, H) fibras colágenas de cores alaranjadas, compactadas e organizadas em feixes ao redor do lúmen. Já, em D18 (Fig.3 B, F D H), observa-se qualitativamente uma maior quantidade de fibras espessas e mais espaçadas.

Estudos histológicos no tecido cervical encontraram resultados similares na ultra estrutura do colágeno, que parte de arranjos de fibras maduras, alinhadas e finas ao início da prenhez, para fibras mais espessas, curvas, com menos ligações cruzadas entre si e em maior quantidade, ao final da prenhez[8, 13]. Comparando as múltíparas (Fig.3 G, H) às primíparas (Fig. 3 E, F), observa-se aparentemente um maior espessamento das fibras colágenas, tanto em D6 quanto em D18, em múltíparas quando comparadas às primíparas.

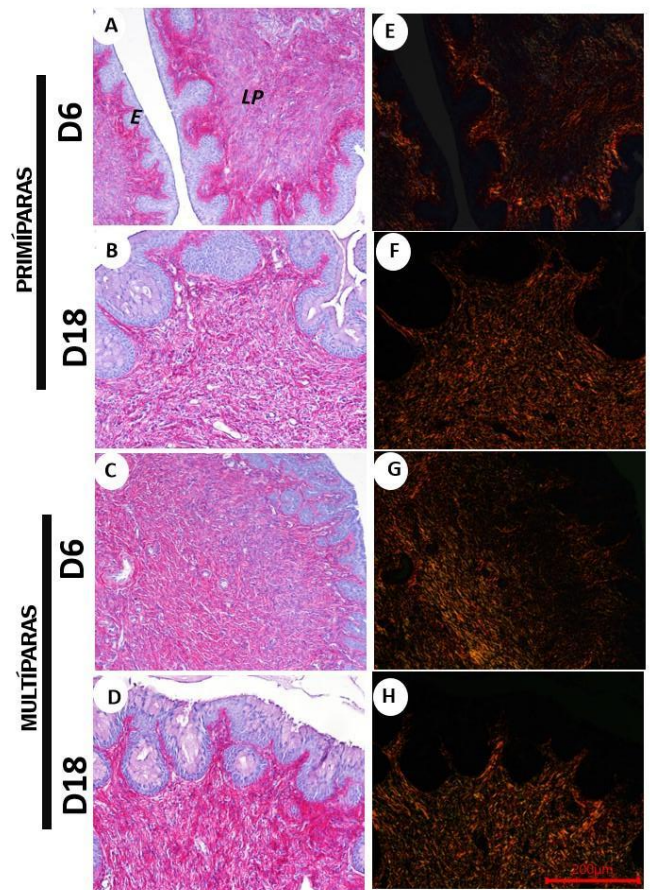


FIGURA 3: Fotomicrografias representativas da secção transversal de cérvice de camundongos primíparas (A, B, E e F) e múltíparas (C, D, G, e H) em D6 e D18, coradas com Sirius Red na objetiva de 20x, polarizadas (E, F, G, H) e não polarizadas (A, B, C, D). Epitélio (E). Lâmina própria (LP). Observe a organização e cor das fibras colágenas sob polarização. Barra de escala H = 200 µm.

Observando os resultados da histoarquitetura da vagina obtidos através do material corado com Sirius Red e

analisado sob luz polarizada, nota-se em D6, tanto em primíparas (Fig 4.A, B, E, F) quanto em múltiparas (Fig.4 C, D, G, H) fibras colágenas organizadas de modo compacto. Já em D18, observa-se nos grupos fibras colágenas mais espessas, evidenciando uma maior quantidade de substância amorfa. Em primíparas, observa-se, em D6, fibras organizadas compactamente e aparentemente de pequena espessura com disposição reticular (Fig.4 E), ao contrário das múltiparas (Fig.4 G). Em D18, observa-se em múltiparas (Fig.4 H) a menor remodelação das fibras, com disposição mais reticular do que aqueles encontrados em primíparas (Fig.4 F). Estudos histológicos quantitativos da parede vaginal em ovelhas múltiparas e prenhes, sugerem que durante a prenhez, há a diminuição da quantidade de fibras colágenas totais e o aumento de fibras elásticas em animais prenhes [12, 15].

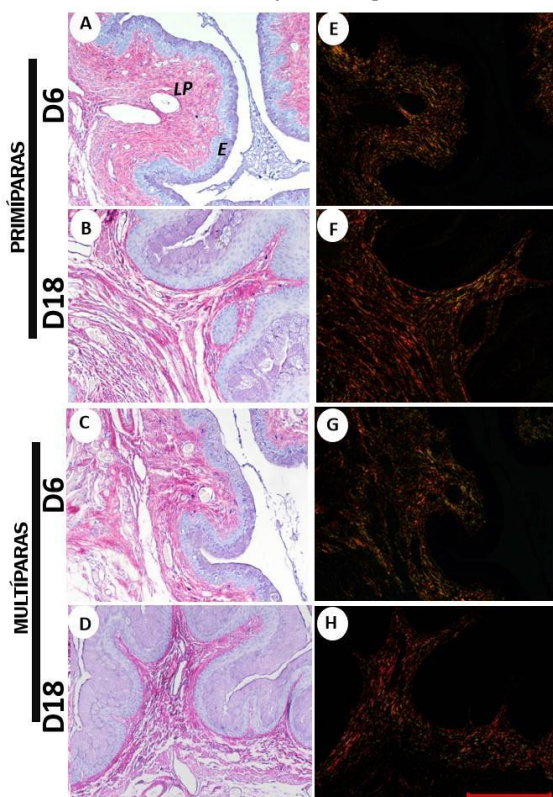


FIGURA 4: Fotomicrografias representativas da secção transversal de vagina de camundongos primíparas e múltiparas em D6 e D18, coradas com Sirius Red na objetiva de 20x não polarizadas, (A, B, C e D) e polarizadas (E, F, G e H). Lâmina própria (LP). Epitélio (E). Observe o lúmen da vagina e a organização das fibras colágenas. Barra de escala H= 200 μ m

Analisando a histoarquitetura das fibras elásticas da cérvix coradas com Fucsina-Resorcina, em primíparas, é possível observar, em D6, fibras elásticas presentes na lâmina própria e estroma, alinhadas em direção ao lúmen (Fig.5 A e C). Já em D18 (Fig.5 B), observa-se fibras elásticas mais espaçadas, localizadas predominantemente na lâmina própria e com uma menor espessura, quantidade e orientação linear, tanto em primíparas quanto em múltiparas. Comparando múltiparas e primíparas,

observa-se fibras mais espessas e em maior quantidade, em múltiparas em D6 e D18 (Fig. 5 C e D). O achado é semelhante ao encontrado em estudos sobre remodelação cervical em camundongos, que constataram que as fibras elásticas durante a prenhez se encurtam, e tornam-se mais grossas perdendo sua direcionalidade comparado ao camundongo não prenhe. Tais fibras desempenham um papel mecânico de suporte de carga e auxílio na recuperação tecidual, sendo assim, a maior quantidade de fibras elásticas presentes na cérvix de múltiparas pode desempenhar um importante papel na conformação tecidual [11].

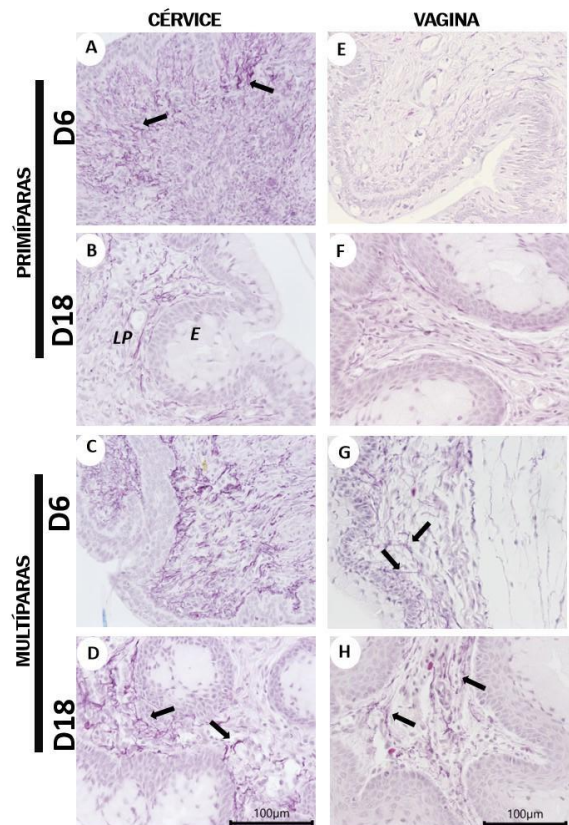


FIGURA 5: Fotomicrografias representativas da secção transversal de cérvix (A, B, C e D) e vagina (E, F, G e H) de camundongos primíparas e múltiparas em D6 e D18 coradas com Fucsina-Resorcina de Weigert sem oxidação na objetiva de 40x. Epitélio (E). Lâmina própria (LP). Observe as fibras elásticas coradas em roxo (setas pretas em A, D, G e H) logo abaixo do epitélio. Nas fotomicrografias observe a organização e densidade das fibras elásticas, que aumentam qualitativamente na cérvix e na vagina em múltiparas quando comparadas às primíparas. Barras de escala D e H =100 μ m.

Nas fotomicrografias das fibras elásticas da vagina (Fig.5 E, F, G e H) observa-se a histoarquitetura das fibras coradas com Fucsina-Resorcina. É possível analisar qualitativamente no D6, fibras delgadas e espaçadas, alinhadas em direção ao lúmen em primíparas (Fig.5 E) e múltiparas (Fig.5 G). No D18, nota-se um aumento na espessura das fibras elásticas, ao final da prenhez, em múltiparas e primíparas (Fig.5 F e H). Comparando múltiparas e primíparas, observa-se fibras mais espessas e em maior quantidade em múltiparas. Os

resultados foram semelhantes aos encontrados nos estudos da parede vaginal de ovelhas, onde as fibras elásticas eram mais espessas e em maior quantidade em múltíparas do que primíparas [15].

Tabela 2: Mensuração parcial do lúmen da vagina e cérvix de camundongos primíparas e múltíparas (mm²)

	Grupo	Primípara	Múltípara	% Aumento*
Vagina	D6	0,38	0,75	97,77
	D18	2,24	2,45	9,07
Cérvix	D6	0,13	0,11	-15,4
	D18	0,38	0,85	124

*porcentagem de aumento do lúmen vaginal e cervical de múltíparas comparado à primíparas

Os resultados parciais da morfometria da vagina e da cérvix foram baseados apenas no N1, sendo necessária ainda a quantificação dos outros 2 N's. A quantificação parcial das áreas do lúmen demonstraram que há remodelação tecidual na vagina e na cérvix, onde a área do lúmen aumenta aproximadamente 6x do D6 ao D18 na vagina em primíparas, e aproximadamente 3,2x em múltíparas. Já na cérvix, o lúmen tem sua área aumentada em cerca de 3x em primíparas e 7,7x em múltíparas, entre o D6 e o D18. Tais dados sugerem que a remodelação ocorreu, mas o retorno à morfologia similar ao nulíparo parece não ocorrer na sua totalidade, permanecendo uma diferença de quase 97%, de área na vagina entre os grupos D6, e 124% entre os grupos D18 da cérvix, comparando primíparas e múltíparas. O mesmo resultado foi encontrado em estudos morfométricos com ratos e ovelhas, onde o lúmen da cérvix e vagina foi maior em múltíparas do que primíparas [11,13,14].

A diminuição em 15,5% da área do lúmen da cérvix no D6 em múltíparas comparado a primíparas, pode ser decorrente do aumento da quantidade e da espessura das fibras elásticas, que auxiliam a manter a elasticidade do tecido, entretanto, mais estudos são necessários.

Em conjunto, os resultados da análise na histoarquitetura da cérvix e da vagina, através de microscopia de luz com diferentes colorações, sugeriram que a multiparidade e a prenhez modificam significativamente a organização dos componentes fibrilares da MEC. As alterações na organização dos componentes são orquestradas principalmente através da atuação de hormônios tais como estrógeno, progesterona e relaxina, que influenciam a expressão de genes que alteram o síntese e deposição das fibras colágenas e elásticas, além da morfologia epitelial [4, 8, 11, 16].

Na cérvix o amolecimento e amadurecimento cervical, durante a prenhez, envolvem mudanças tais como a maior hidratação do tecido, diminuição nas ligações cruzadas, aumento da densidade e declínio da quantidade de fibras colágenas no decorrer da prenhez que

juntamente com o aumento da densidade das fibras elásticas, permitem que o tecido se distenda sem rasgar durante o parto. Entretanto em múltíparas, nossos resultados e a literatura sugerem que as alterações na disposição dos componentes fibrilares da MEC no momento do parto podem resultar em um tecido com propriedades fibrilares biomecanicamente distintas, que a longo prazo podem favorecer o desenvolvimento de POP e a ocorrência do parto prematuro em múltíparas [8, 11, 10].

Na vagina, o aparente aumento do lúmen e da espessura das fibras elásticas, associadas à menor espessura da parede e da reticulação das fibras colágenas conforme a paridade, sugerem que o tecido não consegue se recuperar na sua totalidade após o parto, o que pode culminar no enfraquecimento da parede e na perda da sustentação pélvica, como observado em estudos com ovelhas e camundongos [7, 13, 12]. Tal estudo fornece evidências para a compreensão das alterações teciduais que podem ocorrer no canal de parto mole de mulheres múltíparas, um fator importante na gênese do POP.

Conclusão

Com esse trabalho, demonstramos alterações morfológicas na cérvix e na vagina durante a prenhez, e caracterizamos as diferenças decorrentes da paridade, a qual se demonstra como fator significativo para a remodelação tecidual na cérvix e na vagina, o que deve ser considerado em estudos clínicos do canal do parto que busquem estudar a gênese do POP e do parto prematuro.

Agradecimentos

CNPq, PIBIC.

- Leppert PC, Yu SY. Apoptosis in the cervix of pregnant rats in association with cervical softening. *Gynecol Obstet Invest.* 1994;37(3):150-4.
- Poellmann MJ, Chien EK, McFarlin BL, Johnson AJW. Mechanical and structural changes of the rat cervix in late-stage pregnancy. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2013;17:66-75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbm.2012.08.002>
- Timmons BC, Mahendroo MS. Timing of Neutrophil Activation and Expression of Proinflammatory Markers Do Not Support a Role for Neutrophils in Cervical Ripening in the Mouse¹. *Biol Reprod.* 2006;74(2):236-45.
- Read CP, Word RA, Ruschinsky MA, Timmons BC, Mahendroo MS. Cervical remodeling during pregnancy and parturition: Molecular characterization of the softening phase in mice. *Reproduction.* 2007;134(2):327-40.
- Word RA, Landrum CP, Timmons BC, Young SG, Mahendroo MS. Transgene Insertion on Mouse Chromosome 6 Impairs Function of the Uterine Cervix and Causes Failure of Parturition¹. *Biol Reprod.* 2005;73(5):1046-56.
- Felovich H, Hall TJ, Berghella V. Beyond cervicallength: Emerging technologies for assessing the pregnant cervix. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2012;207(5):345-54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2012.05.015>
- Emmerson S, Young N, Rosamilia A, et al. Ovine multiparity is associated with diminished vaginal muscularis, increased elastic fibres and vaginal wall weakness: implication for pelvic organ prolapse. *Scientific Reports.* 04 abril 2017; 7(45709) DOI 10.1038/srep45709. Disponivel em: <https://www.nature.com/articles/srep45709>
- Yamada A.T., Croy B.A, DeMayo F.J, Adamson S.L. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy.* Academic Press, San Diego, CA, 2014. 776 p
- Myers KM, Paskaleva AP, House M, Socrate S. Mechanical and biochemical properties of human cervical tissue. *Acta Biomater.* 2008;4(1):104-16.
- Timmons, Brenda, Meredith Akins, and Mala Mahendroo. "Cervical remodeling during pregnancy and parturition." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21.6 (2010): 353-361.
- Yoshida K, Jayyosi C, Lee N, Mahendroo M, Myers KM. ; Mechanics of cervical remodelling: insights from rodent models of pregnancy. *Royal Society publishing.* 2019 Jun 28. DOI <http://dx.doi.org/10.1098/rsfs.2019.0026>. Disponivel em: royalsocietypublishing.org/journal/rsfs
- Rynkevici, Rita, et al. "Biomechanical and morphological properties of the multiparous ovine vagina and effect of subsequent pregnancy." *Journal of biomechanics* 57 (2017): 94-102.
- Yoshida, Kyoko, et al. "Quantitative evaluation of collagen crosslinks and corresponding tensile mechanical properties in mouse cervical tissue during normal pregnancy." *PLoS one* 9.11 (2014): e112391.
- Ulrich, Daniela, et al. "Influence of reproductive status on tissue composition and biomechanical properties of ovine vagina." *PLoS one* 9.4 (2014): e93172.
- Alperin, Mariana, et al. "Pregnancy- and delivery-induced biomechanical changes in rat vagina persist postpartum." *International urogynecology*
- Timmons, Brenda C., et al. "Dynamic changes in the cervical epithelial tight junction complex and differentiation occur during cervical ripening and parturition." *Endocrinology* 148.3 (2007): 1278-1287.