



Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ
Centro Biomédico – Faculdade de Ciências Médicas
Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia
e Ciências Cirúrgicas – PG-FISIOCIRURGIA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXCREÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS NA URINA DE USUÁRIAS DE CONTRACEPTIVO ORAL

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas,
PG-Fisiocirurgia, UERJ, como parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso

**Rio de Janeiro, RJ - Brasil
2009**



Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ
Centro Biomédico – Faculdade de Ciências Médicas
Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia
e Ciências Cirúrgicas – PG-FISIOCIRURGIA

Mary Juciane Galvão Zamboni

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXCREÇÃO
DE GLICOSAMINOGLICANOS NA URINA DE
USUÁRIAS DE CONTRACEPTIVO ORAL**

**Rio de Janeiro
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Z24 Zamboni, Mary Juciane Galvão.

Caracterização do perfil de excreção de glicosaminoglicanos na urina de usuárias de contraceptivo oral / Mary Juciane Galvão Zamboni- 2009. vi, 55 f.

Orientador: Luiz Eduardo Macedo Cardoso

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas

Bibliografia: f. 25-30

1. Urina – análise – Teses. 2. Glicosaminoglicanos – Teses. 3. Anticoncepcionais orais hormonais – Teses. I. Cardoso, Luiz Eduardo Macedo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-008.846.1

O presente trabalho foi realizado na Unidade de Pesquisa Urogenital, Centro Biomédico, Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Recebeu apoio financeiro, direta ou indiretamente, de CNPq, FAPERJ e CAPES

AGRADECIMENTOS TÉCNICOS

*Ao professor e orientador, Luiz Eduardo de Macedo Cardoso
pela orientação e apoio.*

*A Carlos Augusto P. Cabral,
Pelo trabalho em equipe e orientações.*

*A Alan e Camila,
Bolsistas de iniciação científica, pela
colaboração na execução dos procedimentos
bioquímicos.*

*A todas voluntárias que concederam a matéria
prima para execução técnica.*

CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflito de interesses.

ÍNDICE

Página

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 - RESUMO	
2 - ABSTRACT	
3 – INTRODUÇÃO	1
4 - OBJETIVO	6
5 - MATERIAIS E MÉTODOS	8
5.1- Descrição da Amostra	9
5.2- Amostras de urina	10
5.3- Isolamento de GAG urinário total das amostras de urina	11
5.4- Análise dos glicosaminoglicanos (GAG)	12
5.5- Outras análises	12
5.6– Estatística	13
6-RESULTADOS	14
7 - DISCUSSÃO	19
8 - CONCLUSÕES	26
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
10 - ANEXOS	36
10.1- Ficha cadastral individual	37
10.2- Aprovação do projeto em Comitê de Ética em Pesquisa	38
10.3 Artigo publicado no <i>International Urogynecology Journal</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH Ácido hexurônico

AHOC Anticoncepcional hormonal oral combinado

CS Condroitin sulfato

DS Dermatan sulfato

EE + C Etinilestradiol + Ciproterona (acetato)

EE + D Etinilestradiol + Drospirinona

EE + G Etinilestradiol + Gestodeno

FSH *Follicle-stimulating hormone* (inglês)

Hormônio folículo estimulante (português)

GAG Glicosaminoglicano

GnRH *Gonadotropin-Releasing Hormone* (inglês)

Hormônio liberador de gonadotrofinas (português)

HS Heparan sulfato

LH *Luteinizing hormone* (inglês)

Hormônio luteinizante (português)

MEC Matriz extracelular

TRH Terapia de reposição hormonal

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXCREÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS NA URINA DE USUÁRIAS DE CONTRACEPTIVO ORAL

Introdução e Hipóteses: Glicosaminoglicanos (GAG) no urotélio e na urina possuem um efeito protetor contra desordens tais com urolitíase e cistite intersticial. Adicionalmente, foi demonstrado que hormônios sexuais femininos podem modular a excreção urinária de GAG (Maroclo M.V. et al. J Urol. 2005;173:1789-92). O presente estudo investigou se os anticoncepcionais hormonais orais combinados (AHOC) influenciam na excreção urinária de GAG.

Métodos: Amostras de urina foram doadas por mulheres jovens que utilizavam anticoncepcionais orais regularmente: EE + D (0,030 mg etinilestradiol + 3,0 mg drospirinona), n=9; EE + C (0,035 mg etinilestradiol + 2,0 mg acetato de ciproterona), n=9; e EE + G (0,020 mg etinilestradiol + 0,075 mg gestodeno), n=7. Controles foram 10 mulheres da mesma faixa etária não usuárias de AHOC. Valores de GAG urinário total das primeira e segunda metades do ciclo menstrual foram expressos como µg ácido hexurônico por mg de creatinina urinária. A proporção de GAG sulfatado foi determinada pela eletroforese em gel de agarose.

RESULTADOS: Em contraste com o grupo controle, a excreção de GAG total na primeira e segunda metades do ciclo menstrual foi bastante similar nos grupos usuários de AHOC. Valores de excreção em todo o ciclo foram

maior no grupo usuário de AHOC ($p < 0,01$), particularmente para o grupo usuário de EE + C, no qual os valores foram o dobro dos valores do controle ($p < 0,005$). Comparados com o controle, os 3 grupos usuários de AHOC produziram diferenças marcantes na composição urinária de GAG sulfatado, com diminuição de aproximadamente 50% no HS ($p < 0,02$) e DS ($p < 0,02$), e um aumento próximo de 100% no CS ($p < 0,004$).

CONCLUSÃO: O padrão de excreção urinário de GAG está claramente alterado em mulheres que ingerem os AHOC estudados. Sendo assim, esta mudança na excreção constitui um efeito benéfico adicional dos AHOC, pois ela aumenta o potencial efeito protetor dos GAG contra desordens do trato urinário.

Unitermos: Glicosaminoglicanos, urina, anticoncepcional hormonal oral.

ABSTRACT

ORAL HORMONAL CONTRACEPTIVES AFFECT THE CONCENTRATION AND COMPOSITION OF URINARY GLYCOSAMINOGLYCANS IN YOUNG WOMEN

INTRODUCTION AND HYPOTHESIS: Glycosaminoglycans (GAG) on the urothelium and in the urine have protective effects against disorders such as urolithiasis and interstitial cystitis. Additionally, we have shown that female sex hormones may modulate urinary GAG excretion (Maroclo MV et al. J Urol 2005;173:1789-92). Here we investigated whether oral hormonal contraceptives (OC) affect urinary GAG excretion.

METHODS: Urine specimens were obtained from young women regularly taking the following OC: EE + D (0.030 mg ethinyl estradiol + 3.0 mg drospirenone), n=9; EE + C (0.035 mg ethinyl estradiol + 2.0 mg cyproterone acetate), n=9; and EE + G (0.020 mg ethinyl estradiol + 0.075 mg gestodene), n=7. Controls were from ten age-matched women not taking OC. Total urinary GAG from the first and second halves of the menstrual cycle was assayed as μg hexuronic acid per mg urinary creatinine. Content of sulfated GAG species was determined by agarose gel electrophoresis.

RESULTS: In contrast to controls, excretion of total GAG in the first and second halves of the menstrual cycle was quite similar in the OC groups. Excretion values for the whole cycle were higher in the OC groups ($p <$

0.01), especially for EE + C, in which the values were twice those from controls ($p < 0.005$). Compared with controls, the three OC produced marked changes in the composition of urinary sulfated GAG, with decreases of ~50% in HS ($p < 0.02$) and DS ($p < 0.02$), and a ~100% increase in CS ($p < 0.004$).

CONCLUSIONS: The pattern of urinary GAG excretion is clearly changed in women taking commonly used OC. However, this altered excretion should constitute an additional beneficial effect of OC, as it enhances the protective effects of GAG against urinary tract disorders.

Key words: Glycosaminoglycans, urine, oral hormonal contraceptives.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A integridade do corpo humano e suas estruturas de sustentação são amplamente dependentes da composição e arranjo do tecido conjuntivo. Desta forma, o espaço extracelular, frequentemente preenchido por componentes fibroconjuntivos denominados de matriz extracelular (MEC), é de importância fundamental para função dos tecidos. A MEC é constituída, em proporções variáveis, por colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAG) e elementos celulares, que se organizam formando uma rede, em parte responsável pela grande diversidade morfológica e funcional [1]. Os múltiplos componentes da matriz dividem-se em dois tipos: moléculas protéicas alongadas que se unem formando estruturas fibrilares, como colágeno e elastina; estruturas não fibrilares que podem ser de dois subtipos, a saber: a) glicoproteínas alongadas como a fibronectina e laminina; b) GAG e proteoglicanos. O colágeno e a elastina são responsáveis pelo arcabouço estrutural e elástico. Já, os GAG e os proteoglicanos formam gel hidrófilo, semifluido que permite a circulação de nutrientes, hormônios e outros mensageiros químicos.

GAG são heteropolissacarídeos que têm como estrutura básica unidades alternadas de hexosamina e açúcar não-nitrogenado unidas por ligações glicídicas. Estas cadeias polissacarídicas foram denominadas de mucopolissacarídeos pela presença em secreções viscosas. Atualmente são referidos como GAG, estando presentes em todas as células animais com diferenças estruturais dependendo do tecido ou do organismo de origem [2]. Os principais GAG são: condroitin sulfato (CS), dermatan sulfato (DS), heparan sulfato (HS), heparina (HEP), queratan sulfato (QS) e ácido

hialurônico (AH). Estes compostos diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não aminado, quanto ao grau e posição de sulfatação, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter e intra dissacarídica. Com exceção do ácido hialurônico, todos os GAG estão ligados covalentemente a esqueleto protéico, formando assim os proteoglicanos [3]. Proteoglicanos são componentes macromoleculares da matriz extracelular (MEC) que desempenham vários papéis na fisiologia celular normal e em estados patológicos [4]. A degradação destes glicoconjugados frequentemente envolve ações de metaloproteinases da matriz extracelular e de um pool de enzimas intracelulares [5].

Hormônios sexuais femininos, em adição a diversos fatores fisiológicos podem modular o remodelamento da MEC, através da atividade das metaloproteinases da matriz e o *turnover* de proteoglicanos em geral, [5] ambos *in vivo* [6] e *in vitro* [7]. Conseqüentemente, a soma e composição dos metabólitos urinários de proteoglicanos, que consiste principalmente de cadeias de GAG livres são, por conseguinte, influenciadas.

Os tratos genital e urinário baixo feminino possuem origem embriológica comum, resultando do seio urogenital. Ambos são sensíveis aos efeitos dos hormônios esteróides sexuais femininos. Os hormônios sexuais possuem uma maior influencia no trato urinário baixo feminino no decorrer da vida adulta, com muitas flutuações em seus níveis levando a modificação: macroscópicas, histológicas e funcionais [8]. Estudos demonstraram, por exemplo, que a excreção urinária de GAG estabelece um paralelo com as flutuações dos hormônios sexuais e está aumentada na primeira metade do ciclo menstrual de mulheres jovens [9]. Em outras condições que são acompanhadas de alterações dos níveis dos hormônios sexuais tais como terapia de reposição hormonal em mulheres na pós

menopausa [10] e em gravidez normal [11] achados também indicam que a excreção urinária de GAG está alterada.

Uma concentração maior de GAG na urina pode ser favorável. Inúmeras pesquisas têm mostrado que estes polímeros polianiônicos possuem efeitos protetores no trato urinário. Por exemplo, GAG reduz a formação de cálculo urinário através de interações específicas que inibem o crescimento de cristais, aglomeração, e aderência [12]. Mecanismos moleculares semelhantes explicam outros efeitos urinários protetores de GAG, tais como contra infecção urinária; que nos Estados Unidos estima-se que seja responsável por seis milhões de consulta/ano [13] e cistite intersticial [14]. De fato, mudanças na concentração normal de GAG total urinário e nas proporções das diferentes espécies de GAG estão associadas com aumento de risco para estas desordens [12-15].

Anticoncepcionais hormonais orais combinados (AHOC) são substâncias amplamente usadas na prevenção de gravidez. Estas drogas consistem em produtos sintéticos equivalentes de hormônios sexuais femininos, e formulações combinadas contendo baixas doses de etinilestradiol e progestogênios [16]. Os AHOC evitam a ovulação pela inibição do pico de secreção de gonadotrofinas, exercendo seu principal efeito sobre os centros hipofisário e hipotalâmico. Além disso, atuam em outros sítios do processo reprodutor; colo uterino, endométrio, tubas uterinas e ovários. No colo uterino promovem alterações físico-químicas do muco, tornando-o espesso e hostil, dificultando a espermomigração. No endométrio diminuem a produção glandular de glicogênio, de tal forma que o blastocisto dispõe de menor quantidade de material energético para sobreviver na cavidade uterina. Nas tubas modificam a contratilidade em grau que depende da estrogenicidade. No ovário, alteram a resposta às gonadotrofinas interferindo com o ciclo dos receptores. Varias evidências

experimentais demonstram que os AHOC proporcionam benefícios adicionais a saúde que incluem: manejo de distúrbios menstruais, redução de risco de câncer de endométrio, ovário, e colorretal [16].

Em razão das atividades esteroidais sexuais dos AHOC, estas medicações também podem afetar o metabolismo dos proteoglicanos e por consequência, modificar a excreção urinária de GAG. Contudo, não há ainda nenhum dado sobre concentração e composição urinária de GAG em mulheres usuárias de terapia com anticoncepcionais hormonais orais.

No presente estudo, analisou-se o GAG urinário isolado de mulheres jovens que estavam usando regularmente três tipos distintos de AHOC. Os valores de excreção obtidos foram então comparados com os de mulheres jovens de mesma idade que não utilizavam esses medicamentos.

OBJETIVO

OBJETIVO:

Caracterizar através de métodos bioquímicos o perfil de excreção dos glicosaminoglicanos urinários durante uso de contraceptivo hormonal oral combinado em mulheres jovens.

MATERIAIS E METÓDOS

MATERIAIS E METÓDOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê local de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Pedro Ernesto na Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ).

Descrição da amostra:

As amostras de urina foram doadas voluntariamente por vinte e cinco estudantes de graduação em medicina (n=22) e pós-graduação *strictu sensu* (n=03), saudáveis, com idade variando até trinta anos, que estavam utilizando os anticoncepcionais hormonais orais combinados regularmente por pelo menos três meses antes de iniciar a pesquisa. Elas foram distribuídas em 3 grupos de acordo com uso dos AHOC:

- (a) Etinilestradiol 0,030 mg + Drosperinona 3,0 mg (EE+D): n = 9, idade (média \pm SD) $24,6 \pm 1,0$ anos;
- (b) Etinilestradiol 0,035 mg + Acetato de ciproterona 2,0 mg (EE+C): n = 9, idade $23,4 \pm 2,0$ anos;
- (c) Etinilestradiol 0,020 mg + Gestodeno 0,075 mg (EE+G), n = 7, idade $23,9 \pm 1,8$ anos. Todos os AHOC foram produzidos pelo Laboratório Bayer Schering (São Paulo, Brasil), e foram ingeridos pelas pacientes de acordo com regime prescrito pelo fabricante.
- Amostras urinárias **controle** foram doadas por 10 estudantes de graduação de medicina saudáveis **não usuárias de AHOC** e idade entre 19 a 21 anos.

Amostras de urina

Cada voluntária realizou a coleta de um total de 6 (seis) amostras de urina no período equivalente a um ciclo menstrual; sendo uma coleta diária matinal. Foram determinados os seguintes dias do ciclo menstrual para coleta da amostra urinária matinal: Os dias 6, 7 e 8 correspondendo à primeira metade do ciclo menstrual e os dias 20, 21 e 22 representando a segunda metade do ciclo menstrual de cada voluntária. Estes dias do ciclo correspondem aos valores mais altos e mais baixos de excreção de GAG respectivamente [9].

Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C sem acréscimo de conservantes e foram mantidas congeladas até serem analisadas. Todas foram selecionadas com base nos critérios de exclusão de história de litíase urinária e renal, índice de massa corporal fora da faixa entre 20 e 25, presença de infecção urinária antes e durante o período do estudo, diabetes mellitus ou outras doenças metabólicas, hipertensão arterial, gestação prévia ou atual e resultados anormais no teste fita reagente (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios de exclusão para o recrutamento de mulheres voluntárias para o estudo:

História de litíase urinária e renal

Índice de massa corporal fora da faixa entre 20 e 25

Presença de infecção urinária antes e durante o estudo

Diabetes mellitus ou outras doenças metabólicas

Hipertensão arterial

Gestação prévia ou atual

Resultados anormais no teste fita reagente

Isolamento de GAG urinário total das amostras de urina

Os GAG foram isolados separadamente de cada amostra de urina diária utilizando uma modificação dos métodos de Pennock [17] e Zebrower [18]. As amostras de urina foram descongeladas no laboratório, filtradas em filtro de papel Whatman nº 40 (Whatman, Inglaterra) e suas densidades foram ajustadas para <1.020 através da adição de água destilada. A seguir, foram acrescentados 152 μL de cloreto de cetilpiridinium (CPC) 10% a 10 mL de urina e, após agitação no vortex, a mistura foi deixada em temperatura ambiente durante 24 horas. O material insolúvel formado, consistindo em um complexo GAG-CPC, foi coletado por centrifugação (3300 RPM, 25 min) em uma centrífuga clínica convencional de bancada, e o precipitado foi lavado com 15 mL de CPC a 0,05% e dissolvido em 2 mL de NaCl 2M:etanol absoluto (100:15, v/v). Foram acrescentados então três volumes de etanol absoluto e a mistura foi mantida a 4°C durante 24 horas a fim de precipitar as cadeias de GAG. Após sucessivas lavagens com etanol a 70% e etanol absoluto, o precipitado final foi secado a 60°C durante 30 minutos. Este precipitado final que é um preparado do GAG urinário total foi dissolvido em 200 μL de água destilada e mantido a -20°C até novas análises.

A recuperação (“recovery”) deste método foi acima de 95% como determinado pelo acréscimo de quantidades conhecidas de GAG padrão a amostras de urina.

Análise dos glicosaminoglicanos (GAG)

A concentração urinária de GAG total nas amostras urinárias foi quantificada pela dosagem do ácido hexurônico através do método do carbazol [19], utilizando a glucoronolactona (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) como padrão. A concentração urinária de GAG total foi expressa em μg de ácido hexurônico por miligrama de creatinina urinária ($\mu\text{g HexUA} / \text{mg creatinina}$).

A proporção das diferentes espécies de GAG sulfatados (heparan sulfato, condroitin sulfato e dermatan sulfato) foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão 50 mM 1,3 diaminopropano (Merck, Darmstadt, Alemanha), pH 9, da preparação total GAG associado com degradação específica com condroitin-liases (Sigma, St Louis, Missouri, EUA). Placas de gel foram digitalizadas em *scanner* de mesa e bandas de GAG em imagens digitais foram quantificadas usando o software Image J versão 1.41 (NIH, Bethesda, Maryland, EUA). A proporção de cada espécie de GAG foi expresso como percentual total de GAG sulfatado.

Outras análises

As amostras de urina também foram testadas com fita reagente (Multistix 10G, Bayer, Tarrytown, Nova York, EUA) para leucócitos, eritrócitos, pH, densidade, proteínas totais, e glicose. Creatinina urinária foi determinada por um ensaio enzimático automatizado (Sera-Pack, Bayer, Tarrytown, Nova York, EUA).

Estatística

Cada uma das amostras de urina diária foi analisada separadamente, e o valor de média da concentração de GAG foi então calculado por primeira (dias 6, 7, 8) e segunda (dias 20, 21, 22) metades do ciclo menstrual. Um valor de média para o ciclo total foi também calculado usando os resultados individuais das duas metades. Resultados de cada parâmetro bioquímico foram analisados pela *one-way* ANOVA seguido pelo método de Bonferroni para comparação pareada ou o teste *F*. Valores de GAG urinário das primeira e segunda metades do ciclo menstrual foram analisados pelo teste-t pareado.

Todos os resultados foram considerados como médias \pm seus desvios padrões (SD), e significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

No presente estudo, as jovens não usuárias de AHOC tiveram padrão bifásico de excreção urinária de GAG total, com valores mais altos encontrados na primeira metade do ciclo menstrual comparados com a segunda metade; mas em mulheres jovens usuárias dos grupos de AHOC compostos de etinilestradiol e um progestogênio, não houve diferença significativa na excreção de GAG total entre as duas metades do ciclo menstrual.

A Tabela 2 mostra que os valores de excreção urinária de GAG total nas primeira e segunda metade do ciclo menstrual em usuárias dos grupos de AHOC estudados foram muitos similares.

Em função disto, uma média de valor de excreção foi calculada para todo ciclo menstrual de cada grupo, estes resultados foram comparados com aqueles das mulheres não usuárias de AHOC.

Os resultados mostraram que a excreção urinária de GAG tende a ser maior em mulheres usuárias de AHOC, o que é confirmado pelo fato de que os três grupos de AHOC em conjunto são diferentes do grupo controle ($p < 0,01$). Entretanto, a comparação individual dos grupos de AHOC, indicou que somente o grupo EE+C, foi significativamente diferente ($p < 0.005$), com valores de excreção de GAG mais de duas vezes superiores aos valores das mulheres não usuárias de AHOC.

Os GAG sulfatados detectados em todas as amostras foram heparan sulfato (HS), dermatan sulfato (DS), e condroitin sulfato (CS).

A análise quantitativa dos valores destas proporções de GAG em cada um dos grupos de AHOC, não diferiu entre a primeira e segunda metade do ciclo menstrual. Estes 2 valores de cada metade foram combinados do mesmo modo como foi realizado no cálculo de GAG total. Em contraste

com os resultados encontrados de GAG urinário total, as proporções relativas de GAG sulfatados foram muito similares entre as usuárias dos diferentes tipos de AHOC. Todavia, quando comparadas com valores de mulheres sem tratamento, os 3 grupos de AHOC produziram diferenças marcantes na composição de GAG sulfatados, com diminuição de aproximadamente 50% no HS ($p < 0,02$), e DS ($p < 0,02$), e um aumento de cerca de 100% no CS ($p < 0,004$).

Tabela 2. Excreção de glicosaminoglicanos urinários totais na primeira e segunda metades do ciclo menstrual em mulheres usuárias de anticoncepcionais hormonais orais combinados (AHOC).

	Não usuárias	EE+D	EE+C	EE+G
Número de indivíduos	10	9	9	7
Primeira metade do ciclo	0,446 +_0,171	0,776 ± 0,551	0,833 ± 0,419	0,634 ± 0,202
Segunda metade do ciclo	0,374 +_0,166*	0,797 ± 0,602	1,075 ± 0,588	0,565 ± 0,324

*As duas médias são significativamente diferentes ($p < 0.001$)

Concentração de GAG total urinário foi determinada como μg de ácido hexurônico por mg de creatinina, e os números são médias \pm SD (desvio padrão). Valores da primeira metade são médias de concentrações nos dias 6, 7 e 8, enquanto aqueles da segunda metade são médias de concentrações nos dias 20, 21, e 22 do ciclo menstrual. Para cada grupo, o valor de concentração média nas primeira e segunda metades do ciclo menstrual foram comparadas usando o teste t pareado.

Tabela 3. Média de excreção de glicosaminoglicanos urinários totais durante o ciclo menstrual em mulheres usuárias e não usuárias de anticoncepcionais hormonais orais combinados (AHOC).

	Não usuária de AHOC	EE+D	EE+C	EE+G
Número de indivíduos	10	9	9	7
Média de excreção, ciclo total	0,412 ± 0,167	0,754 ± 0,491	0,954 ± 0,420(*)	0,599 ± 0,204

Concentração de GAG urinário total foi determinada como µg de ácido hexurônico por mg de creatinina, e os números são médias ± SD (desvio padrão). A média de excreção para o ciclo menstrual total foi determinada pelo primeiro cálculo, para cada paciente, a média das concentrações nas primeira e segunda metade do ciclo. A média foi então calculada para o grupo.

As quatro médias são significativamente diferentes (one-way ANOVA, $p < 0,025$). * Significativamente diferente do grupo de não usuárias de AHOC (Bonferroni test, $p < 0,005$). Uma série dos três grupos de usuárias de AHOC é significativamente diferente do grupo de não usuárias de AHOC (test F , $p < 0,01$).

Tabela 4. Proporções de glicosaminoglicanos sulfatados em amostras de urina de mulheres usuárias e não usuárias de anticoncepcionais hormonais orais combinados (AHOC).

	Não usuária de AHOC	EE+D	EE+C	EE+G
Número de indivíduos	10	9	9	7
HS	57,97 ± 13,46	30,17 ± 11,41	33,48 ± 17,50	30,54 ± 7,06
DS	9,79 ± 3,37	4,61 ± 2,53	4,53 ± 1,54	4,81 ± 2,0
CS	32,18 ± 11,80	66,61 ± 12,65	66,34 ± 20,76	64,65 ± 7,46

Proporções de heparan sulfato (HS), dermatan sulfato (DS), e condroitin sulfato (CS) foram indicadas como percentual de GAG sulfatado, e os números são médias \pm SD. A média de concentração de todo ciclo menstrual foi determinada pelo primeiro cálculo, para cada paciente, a média das concentrações nas primeira e segunda metade do ciclo. A média foi então calculada para o grupo.

A proporção de cada espécie de GAG foi significativamente diferente entre os grupos (one-way ANOVA, $p < 0.001$). Comparação combinada usando método de Bonferroni mostrou que HS, DS, e CS nos grupos de usuárias de anticoncepcionais hormonais orais combinados são significativamente diferentes do grupo que não utilizavam estes medicamentos ($p < 0,02$, $p < 0,02$, e $p < 0,004$, respectivamente).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que os anticoncepcionais hormonais orais combinados (ACOH) afetam de várias formas a concentração e a composição de GAG na urina. Adicionalmente, os efeitos globais dos três AHOC tenderam a ser similares devidos: (a) todos eles suprimem a variação da concentração de GAG total durante o ciclo menstrual; (b) embora somente EE+C aumente significativamente a concentração de GAG urinário total, houve uma perceptível tendência para os dois outros AHOC produzirem o mesmo efeito, e uma série composta dos três AHOC foi significativamente diferente do controle, e (c) os três AHOC produziram estatisticamente as mesmas modificações nas proporções de GAG sulfatados.

Anticoncepcionais hormonais orais combinados inibem a ovulação, principalmente através da supressão dos níveis séricos de FSH e LH durante o ciclo menstrual. AHOC são constituídos por diferentes produtos sintéticos equivalentes aos hormônios sexuais femininos, aqueles utilizados neste estudo com formulações com etinilestradiol e progestogênios. Além disto, os progestogênios podem ter atividade antiandrogênica [16]. Todos estes hormônios, ou substâncias sintéticas hormonais, podem modular a síntese e a degradação de proteoglicanos de diferentes formas, e seus efeitos podem não depender somente do tipo de hormônio como também da dose de hormônio administrada. Por exemplo, em mulheres na pós-menopausa, estradiol aumenta os níveis circulantes de ácido hialurônico, enquanto o acetato de medroxiprogesterona tem efeito oposto. No mesmo grupo de mulheres, 2mg de estradiol diários elevaram os níveis séricos de ácido hialurônico, mas 4 mg não tiveram efeito [20]. Além disso, metabólitos de proteoglicanos na urina são particularmente afetados,

devido à alta concentração de receptores hormonais sexuais no trato urinário [21]. Entretanto, a interpretação dos efeitos dos AHOC na excreção urinária dos GAG depende de uma variedade de eventos endócrinos complexos.

Os três grupos de AHOC do estudo contêm etinilestradiol em doses comparáveis, mas diferentes tipos e doses de progestogênios. Contudo a composição destes três AHOC são equivalentes, de uma maneira geral, e este panorama é compatível com os resultados deste estudo mostrando a similaridade global dos efeitos da excreção urinária de GAG.

AHOC têm sido utilizados como terapia de reposição hormonal em especial em estados hipoestrogênicos, devido ao seu conteúdo estrogênico [22]. Por outro lado, a excreção urinária de GAG está elevada em condições onde os estrogênios circulantes estão aumentados, como durante o ciclo menstrual [9], durante a gravidez [11], em mulheres na pós-menopausa em terapia de reposição hormonal [10]. Assim, em mulheres jovens usuárias de AHOC, esta adição dos níveis circulantes de estrogênio poderia compensar a variação normal sofrida por este hormônio durante o ciclo menstrual, de tal forma que a diferença da excreção de GAG existente entre a primeira e segunda metade do ciclo menstrual [9] seria menos pronunciada, como mostram nossos resultados.

Em condições normais, a filtração renal de GAG é pequena, e a maioria das cadeias excretadas é derivada do *turnover* normal de proteoglicanos que ocorre localmente no glomérulo e ao longo do trato urinário [23]. Nesses tecidos, proteoglicanos são primeiramente degradados pelas metaloproteinases da matriz extracelular, seguidos da despolimerização intracelular resultando em cadeias de GAG livres pelas enzimas lisossomiais [5]. Os efeitos do estrogênio no metabolismo de proteoglicanos não incluem somente a inibição da síntese de moléculas da matriz extracelular pelas células mesenquimais [24], mas também uma

regulação direta na expressão de enzimas degradativas de proteoglicanos / GAG [25]. Em conjunto, estes efeitos podem aumentar a degradação de proteoglicanos e a produção de metabólitos. Portanto, a ação destes efeitos no trato urinário são compatíveis, pelo menos em parte, com o aumento da excreção de GAG nas usuárias de AHOC.

Em estudo com ratas ooforectomizadas, de Deus *et al* [6] observaram que a concentração de GAG total na parede da bexiga foi menor em 40% e as proporções de GAG sulfatados foram diferentes. O tratamento dos animais com um equivalente sintético do estrogênio ou um progestogênio teve pequeno ou nenhum efeito nestas alterações. Entretanto, quando os dois hormônios foram combinados, a concentração e composição de GAG da parede vesical foi completamente restabelecida. Estes achados sugerem que hormônios combinados agem sinergicamente promovendo uma elevada síntese de proteoglicanos na parede da bexiga. Como o protocolo de tratamento naquela investigação simula os AHOC combinados, pode-se especular que estes medicamentos levam a um aumento de acúmulo de proteoglicanos na parede vesical. Além disso, em humanos há uma forte marcação imunohistoquímica para o condroitin sulfato na parede vesical, especialmente no urotélio [26]. Na medida em que *turnover* de proteoglicano urinário é a principal fonte de GAG urinário [23], estes achados proporcionam evidência adicional para nossos resultados mostrando um aumento da excreção de GAG e pode explicar a elevação do condroitin sulfato nas amostras de urina de usuárias de AHOC.

A modulação do *turnover* de proteoglicanos por FSH e LH é geralmente relacionada com a ovulação, incluindo aumento da expressão do proteoglicano de condroitin sulfato versican no corpo lúteo [27] e degradação de sulfato de heparan por heparanases durante ruptura folicular [28]. Adicionalmente, um dos progestogênios utilizados em ACOH, a drospirina, é conhecida por ter efeitos antiandrogênicos [16] e em útero

de ratos, o androgênio leva à pronunciadas mudanças nas proporções de GAG [29]. Entretanto, os efeitos do FSH, LH e androgênios no trato urinário são pouco conhecidos. Ainda, devido aos seus vários efeitos nos proteoglicanos ovariano e uterino, os níveis suprimidos destes hormônios nas mulheres em uso de AHOC podem ter um impacto no *turnover* de proteoglicanos e podem estar implicados em mudanças no GAG urinário como descrito.

As causas freqüentes de dor pélvica em mulheres incluem endometriose e cistite intersticial [30]. A fisiopatologia da endometriose possui uma clara influência hormonal, e dados clínicos recentes mostram que AHOC são eficazes no tratamento da dor pélvica associada a esta patologia [31]. Embora não esteja esclarecido, a dor pélvica ligada à cistite intersticial parece estar relacionada a um defeito na camada urotelial na qual os componentes de GAG podem ser alterados [26,32]. Conseqüentemente, compostos urinários infiltrariam a parede vesical e causariam reações inflamatórias e / ou estimulação nervosa que justificaria a maioria das manifestações clínicas da cistite intersticial [33,34]. Um dos principais tratamentos para esta doença é, de fato, a administração oral ou tópica de GAG ou compostos similares aos GAG, os quais presumivelmente, restauram a camada urotelial [35]. Interessantemente, existem evidências, embora limitadas a poucos pacientes, que AHOC melhoram os sintomas em mulheres acometidas por cistite intersticial [33], um achado que, novamente, está de acordo com nossos resultados.

Sabe-se que uma concentração aumentada de GAG urinário protege o trato urinário contra infecção [13]. Como nossos resultados mostraram que o uso dos AHOC aumenta a concentração de GAG urinário, uma expectativa seria que as usuárias de AHOC seriam menos susceptíveis a infecções do trato urinário. Contudo, evidências experimentais demonstram que isto não ocorre porque AHOC podem ser um fator de risco para

infecção urinária em mulheres jovens [34]. Uma possível explicação para estes dados discrepantes é que o uso de AHOC está associado com outras modificações no trato urinário, como alteração epitélio e baixo fluxo sanguíneo, que favorece infecção [8]. Outra desordem que pode ser prevenida pelo aumento da excreção urinária de GAG é a litíase urinária [12,15]. Embora nenhuma correlação tenha sido realizada até então entre uso de AHOC e a incidência de cálculo no trato urinário, tendo em vista os resultados deste experimento, há um potencial deste benefício com uso destas medicações. Os efeitos protetores dos GAG discutidos acima são principalmente devido às interações específicas entre estes poliânions e outras moléculas ou superfície celular. A afinidade desta interação pode variar dependendo das características estruturais das cadeias de GAG, tais como carga e densidade [36]. Tipicamente, a taxa de densidade do HS é menor, enquanto que CS é maior [36].

De acordo com os resultados deste trabalho, em mulheres usuárias destes AHOC, a concentração urinária de HS é menor, enquanto que a do CS é próxima do dobro. Conseqüentemente, estas alterações juntamente com o aumento de GAG total, indicam que o uso de AHOC aumentaria o efeito protetor do GAG urinário.

Apesar da significância estatística dos achados deste experimento, um estudo dos efeitos dos AHOC nos GAG urinários se beneficiaria de uma amostra maior de doadoras de urina. Isto poderia mostrar, por exemplo, que a excreção urinária de GAG total é significativamente maior em usuárias de outros AHOC, em adição àquelas mostrados no presente estudo. Neste trabalho, investigou-se uma forma de apresentação farmacológica e as formulações de AHOC mais comumente usadas. Entretanto, na perspectiva de potenciais vantagens do aumento da excreção de GAG urinário, valeria a pena determinar se outras apresentações, como o trans-dérmico, vaginal, implante, e injetável, influenciariam na excreção de GAG. Foi demonstrado

recentemente, por exemplo, que as terapias de reposição hormonal oral e transdérmica em mulheres na pós menopausa possuem efeitos diferentes nos níveis séricos de ácido hialurônico [20]. Neste experimento, verificou-se que AHOC, um método contraceptivo largamente usado, possui benefícios adicionais à saúde por alterar a excreção urinária de GAG.

Por outro lado, AHOC contém formulações sintéticas de estrogênio e progestogênio, que entre elas possuem efeitos diferentes, opostos e sinérgicos no *turnover* dos proteoglicanos, como discutido no presente estudo. Contudo, conhecimentos mais precisos sobre estes efeitos no metabolismo de proteoglicanos requerem experimentos nos quais os hormônios sejam testados separadamente.

Em conclusão, este estudo verificou que o uso de AHOC aumenta a quantidade e modifica a composição de GAG urinário. Estas moléculas têm efeito protetor contra desordens do trato urinário tais como urolitíase e cistite intersticial e este padrão alterado de excreção de GAG urinário deve, portanto, aumentar seus benefícios.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os valores de excreção urinária de GAG total na primeira e segunda metades do ciclo menstrual de mulheres jovens usuárias de anticoncepcional hormonal oral combinado são similares.

A excreção urinária de GAG total é maior nas usuárias de anticoncepcional hormonal oral combinado em relação às não usuárias.

As proporções das espécies de GAG excretadas na urina de mulheres que utilizam anticoncepcional hormonal oral combinado estão alteradas em relação às mulheres não usuárias. Há um aumento na excreção de condroitin sulfato e uma diminuição do heparan sulfato e dermatan sulfato.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkötter O, Shephard P, Mauch C, Krieg T. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol.* 2000 Aug;19 (4):325-32.
- 2- Cechowska-Pasko M, Palka J. Age-dependent changes in Glycosaminoglycans content in skin of fasted rats: a possible mechanism. *Exp Toxicol Pathol* 2000 May;52(2):127-31.
- 3- Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997 Jul; 242(1):27-33.
- 4- Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature.* 2007; 446:1030–1037.
- 5- Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem.* 2007; 15 (6):2223–2268.
- 6- de Deus JM, Girão MJ, Sartori MG, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Nader HB, Dietrich CP. Glycosaminoglycan profile in bladder and urethra of castrated rats treated with estrogen, progestogen, and raloxifene. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189:1654–1659.

7- Tanaka K, Nakamura T, Takagaki K, Funahashi M, Saito Y, Endo M. Regulation of hyaluronate metabolism by progesterone in cultured fibroblasts from the human uterine cervix. *FEBS Lett.* 1997; 402:223–226.

8- Pinggera GM, Feuchtner G, Frauscher F, Rehder P, Strasser H, Bartsch G, Herwig R Effects of local estrogen therapy on recurrent urinary tract infections in young females under oral contraceptives. *Eur Urol.* 2005; 47:243–249.

9- Maroclo MV, Pereira SD, Sampaio FJ, Cardoso LE. Urinary glycosaminoglycan excretion during the menstrual cycle in normal young women. *J Urol.* 2005; 173:1789–1792.

10- Brollo J, Maroclo M, Sampaio F, Cardoso L. Urinary glycosaminoglycan excretion in postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Eur Urol.* 2006; Suppl 5:40.

11- Maroclo M, Cabral C, Pereira S, Sampaio F, Cardoso L. Excretion of urinary glycosaminoglycans during normal pregnancy and puerperium in young women. *Eur Urol.* 2006; Suppl 5:41.

12- Boevé ER, Cao LC, Verkoelen CF, Romijn JC, de Bruijn WC, Schröder FH. Glycosaminoglycans and other sulphated polysaccharides in calculogenesis of urinary stones. *World J Urol.* 1994; 12:43–48.

13- Stabellini G, Calastrini C, Gilli P, Bedani PL. Urinary glycosaminoglycans in recurrent urinary tract infections in kidney transplant patients. *Biomed Pharmacother.* 1999; 53:274–277.

14- Wei DC, Politano VA, Selzer MG, Lokeshwar VB. The association of elevated urinary total to sulfated glycosaminoglycan ratio and high molecular mass hyaluronic acid with interstitial cystitis. *J Urol.* 2000; 163:1577–1583.

15- Gohel MD, Shum DK, Tam PC. Electrophoretic separation and characterization of urinary glycosaminoglycans and their roles in urolithiasis. *Carbohydr Res.* 2007; 342:79–86.

16- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Hormonal contraception: recent advances and controversies. *Fertil Steril.* 2008; 90(5 Suppl):S103–113.

17- Pennock CA. A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolysaccharidosis. *J Clin Path.* 1976; 29: 111-123.

18- Zebrower ME, Kieras FJ, Brown WT. Analysis by high-performance liquid chromatography of hyaluronic acid and chondroitin sulfates. *Anal Biochem.* 1986; 157:93-99.

19- Taylor KA, Buchanan-Smith JG. A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Anal Biochem.* 1992; 201: 190-196.

20- Tuomikoski P, Aittomaki K, Mikkola TS, Ropponen A, Ylikorkala O. Effect of oral and transdermal hormone therapy on hyaluronic acid in women with and without a history of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198:375.e1-5.

21- Batra SC, Iosif CS. Progesterone receptors in the female lower urinary tract. *J Urol.* 1987; 138:1301–1304.

22- Chen EC, Brzyski RG. Exercise and reproductive dysfunction. *Fertil Steril.* 1999; 71:1-6.

23- Lee EY, Kim SH, Whang SK, Hwang KY, Yang JO, Hong SY. Isolation, identification, and quantitation of urinary glycosaminoglycans. *Am J Nephrol.* 2003; 23:152-157.

24- Barchiesi F, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Fingerle J, Dubey RK. Methoxyestradiols mediate estradiol-induced antimitogenesis in human aortic SMCs. *Hypertension*. 2002; 39:874–879.

25- Xu X, Ding J, Rao G, Shen J, Prinz RA, Rana N, Dmowski WP. Estradiol induces heparanase-1 expression and heparin sulphate proteoglycan degradation in human endometrium. *Hum Reprod*. 2007; 22:927-937.

26- Slobodov G, Feloney M, Gran C, Kyker KD, Hurst RE, Culkin DJ. Abnormal expression of molecular markers for bladder impermeability and differentiation in the urothelium of patients with interstitial cystitis. *J Urol*. 2004; 171:1554-1558.

27- Richards JS. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol*. 2005; 234:75-79.

28- Klipper E, Tatz E, Kisliouk T, Vlodaysky I, Moallem U, Schams D, Lavon Y, Wolfenson D, Meidan R. Induction of heparanase in bovine granulosa cells by luteinizing hormone: possible role during the ovulatory process. *Endocrinology*. 2009; 150:413–421.

29- Ji H, Dailey TL, Long V, Chien EK. Androgen-regulated cervical ripening: a structural, biomechanical, and molecular analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198:543.e1-9.

30- Ortiz DD. Chronic pelvic pain in women. *Am Fam Physician.* 2008; 77:1535-1542.

31- Harada T, Momoeda M, Taketani Y, Hoshiai H, Terakawa N. Low-dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Fertil Steril.* 2008; 90:1583–1588.

32- Hauser PJ, Dozmorov MG, Bane BL, Slobodov G, Culkin DJ, Hurst RE. Abnormal expression of differentiation related proteins and proteoglycan core proteins in the urothelium of patients with interstitial cystitis. *J Urol.* 2008; 179:764-769.

33- Lentz GM, Bavendam T, Stenchever MA, Miller JL, Smallldridge J. Hormonal manipulation in women with chronic, cyclic irritable bladder symptoms and pelvic pain. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186:1268-1271.

34- Finer G, Landau D. Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4:631-635.

35- Parsons CL. The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis. *Urology*. 2007; 69:9–16.

36- Cardoso LEM, Mourao PAS. Glycosaminoglycan fractions from human arteries presenting diverse susceptibilities to atherosclerosis have different binding affinities to plasma low density lipoproteins. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14:115-124.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1. FICHA CADASTRAL INDIVIDUAL

NOME:	CÓDIGO:
TELEFONE: CELULAR:	
RESIDÊNCIA:	
E-MAIL:	
ANTICONCEPCIONAL EM USO:	
DATA DA ÚLTIMA MENSTRUACÃO:	
IDADE:	
COR: <input type="checkbox"/> BRANCA <input type="checkbox"/> NEGRA <input type="checkbox"/> PARDA	
PESO:	ALTURA: IMC:
ESTADO CIVIL: <input type="checkbox"/> SOLTEIRA <input type="checkbox"/> CASADA <input type="checkbox"/> SEPARADA JUDICIALMENTE <input type="checkbox"/> VIVE MARITALMENTE	
ESCOLARIDADE: <input type="checkbox"/> SUPERIOR <input type="checkbox"/> MÉDIO <input type="checkbox"/> PRIMÁRIO	
QUANTO TEMPO USA ACO: <input type="checkbox"/> até 1 MÊS <input type="checkbox"/> 1 a 3 MESES <input type="checkbox"/> 3 a 6 MESES <input type="checkbox"/> > 1 ANO	
QUANTO TEMPO USA ESTE AHC:	
PROBLEMAS GINECOLÓGICOS PRÉVIOS: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
QUAL(IS)?	
DATA:	
CIRURGIAS PRÉVIAS: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
QUAL(IS):	
USO DE MEDICAÇÃO CONCOMITANTE: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
NOMES:	
TEMPO DE USO:	
PROBLEMA RENAL PRÉVIO: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
QUAL (IS):	
LITÍASE RENAL: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
HÁBITO ALIMENTAR: <input type="checkbox"/> VEGETARIANO RESTRITO	
<input type="checkbox"/> NORMAL COM PROTEÍNA ANIMAL	

ANEXO 2. APROVAÇÃO DO PROJETO EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



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



Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2008

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Profª. Patrícia Maria C. O. Duque
Para: Aut. Mary Juciane G. Zamboni
Orient Prof. Luiz Eduardo M. Cardoso

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (2304-CEP/HUPE) "CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXCREÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS NA URINA DE USUÁRIAS DE CONTRACEPTIVO ORAL" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

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

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



Profª. Patrícia Maria C. O. Duque
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa

Oral hormonal contraceptives affect the concentration and composition of urinary glycosaminoglycans in young women

Mary J. G. Zamboni · Carlos A. P. Cabral ·
Francisco J. B. Sampaio · Luiz E. M. Cardoso

Received: 26 January 2009 / Accepted: 11 June 2009 / Published online: 4 July 2009
© The International Urogynecological Association 2009

Abstract

Introduction and hypothesis Urinary glycosaminoglycans (uGAG) have protective effects against urinary tract disorders. Here we investigated whether oral hormonal contraceptives (OC) affect uGAG excretion.

Methods Urine specimens were from young women regularly taking: ethinyl estradiol+drospirenone, $n=9$; ethinyl estradiol+cypoterone acetate, $n=9$; and ethinyl estradiol+gestodene, $n=7$. Controls were from ten women not taking OC. Total uGAG was assayed as hexuronic acid/urinary creatinine. Sulfated uGAG species was determined by electrophoresis.

Results Unlike controls, total uGAG in the two halves of the menstrual cycle was similar in the OC groups. Whole cycle uGAG was higher in the OC groups ($p<0.01$), especially for ethinyl estradiol+cypoterone acetate ($p<0.005$). The three OC produced decreases of ~50% in heparan sulfate ($p<0.02$) and dermatan sulfate ($p<0.02$), and a ~100% increase in chondroitin sulfate ($p<0.004$).

Conclusions uGAG excretion is changed in women taking OC, and this might enhance the protective effects of these molecules against urinary tract disorders.

Keywords Oral contraceptives · Urinary glycosaminoglycan · Proteoglycan metabolism · Interstitial cystitis

Introduction

Proteoglycans are macromolecular components of the extracellular matrix that play various roles in normal cell physiology and in pathologic states [1]. Degradation of these often large glycoconjugates usually involves the extracellular action of matrix metalloproteinases and of a pool of intracellular enzymes [2]. In addition to several physiological factors, female sex hormones can also modulate the activity of matrix metalloproteinases and proteoglycan turnover in general [2], both in vivo [3] and in vitro [4]. Consequently, the amount and composition of proteoglycan urinary metabolites, which consist mainly of free glycosaminoglycan (GAG) chains, are also affected. We have shown, for example, that urinary GAG excretion parallels sex hormone fluctuations and is increased in the first half of the normal menstrual cycle in young women [5]. We also have data indicating that, in other conditions that are accompanied by altered female sex hormone levels, as in hormone replacement therapy in postmenopausal women [6] and in normal pregnancy [7], urinary GAG excretion is changed.

A higher content of GAG in the urine may be advantageous as a number of studies have shown that these polyanionic polymers have protective effects on the urinary tract. For example, GAG decreases urinary stone formation through specific interactions that inhibit crystal growth, agglomeration, and adherence [8]. Similar molecular mechanisms explain other protective effects of urinary GAG such as against urinary infection [9] and interstitial cystitis [10]. In fact, changes in normal urinary concentration of total GAG and in the relative contents of the different GAG species are associated with increased risks for these disorders [8–11].

M. J. G. Zamboni · C. A. P. Cabral · F. J. B. Sampaio ·
L. E. M. Cardoso (✉)
Urogenital Research Unit—UERJ,
State University of Rio de Janeiro,
Av. 28 de Setembro, 87-fundos-FCM-térreo,
Rio de Janeiro, RJ 20551-030, Brazil
e-mail: luizemcardoso@gmail.com

Oral hormonal contraceptives (OC) are one of the most widely used methods for pregnancy prevention. These drugs consist of synthetic analogues of female sex hormones, and the combined formulations currently used typically contain low doses of an estrogen and of a progestin [12]. Several studies have shown that, besides preventing pregnancy, OC provide health benefits that include the management of menstrual bleeding disorders and reduced risks for endometrial, ovarian, and colorectal cancer [12]. Because of the sex steroid activities of OC, these drugs might also affect proteoglycan metabolism and hence modify urinary GAG excretion. Therefore, OC might have additional health benefits related to increased GAG excretion, as described above. However, there is no data yet on urinary GAG concentration and composition in women under OC therapy.

In the present study, we analyzed urinary GAG isolated from young women who were regularly using three different types of OC. The obtained excretion values were then compared with those from similarly aged women who were not taking these drugs.

Materials and methods

The experimental protocol described herein was approved by the Ethical Committee for Human Experimentation of the State University of Rio de Janeiro.

Patients and urine specimens

A total of 25 white undergraduate medical and graduate nutrition students who were already regularly taking OC for at least 3 months before the beginning of the experiments were enrolled in this study. They were assigned to the following three groups according to the combined OC under use: (a) 0.030 mg ethinyl estradiol+3.0 mg drospirone (EE+D), $n=9$, age (mean \pm SD) 24.6 \pm 1.0 years; (b) 0.035 mg ethinyl estradiol+2.0 mg cyproterone acetate (EE+C), $n=9$, age 23.4 \pm 2.0 years; and (c) 0.020 mg ethinyl estradiol+0.075 mg gestodene (EE+G), $n=7$, age 23.9 \pm 1.8 years. These three OC are the most commonly taken in the population under study, and they were from Bayer Schering Pharma (São Paulo, Brazil). All OC were taken by the patients according to the manufacturer's prescribed regimen. Control urine specimens were donated by ten undergraduate medical students not using OC and aged 19 to 21 years.

As urinary excretion of GAG varies during the menstrual cycle [5], three daily urine specimens were collected in the middle of the first half of the cycle (days 6, 7, and 8), and three in the middle of the second half (days 20, 21, and 22). These days of the cycle correspond to the highest and

lowest GAG excretion values, respectively [5]. All specimens were collected early in the morning, after which they were immediately frozen without adding preservatives, and were stored at -20°C until further analyses.

All participant women were healthy and were not taking medications, other than OC, during or shortly before the study. Enrollment in all groups was also dependent on exclusion criteria which included irregular menstrual cycles, history of bladder or renal stones, body mass index outside the 20–25 range, urinary infection shortly before or during the time frame of this study, diabetes mellitus or other metabolic diseases, hypertension, any current or previous pregnancy, and abnormal result in dipstick test (see below).

Isolation of total GAG from urine specimens

Total GAG was isolated separately from each daily urine specimen according to a previously described protocol [5]. Briefly, urine specimens were thawed, filtered on standard filter paper, and their densities were adjusted to <1.020 by adding distilled water. Cetylpyridinium chloride was then added to the diluted urine to a final concentration of 0.1%, and after 24 h at room temperature, precipitates were collected by centrifugation (3,000 \times g, 30 min). The pellet was then dissolved in 2 M NaCl, and GAG chains were precipitated by adding three volumes of absolute ethanol. After 24 h at -20°C , the mixture was centrifuged (3,000 \times g, 30 min) and the pellet was washed with a series of ethanol solutions. The final pellet, which consisted of total urinary GAG, was dried at 60°C , dissolved in distilled water, and kept at -20°C until further analyses.

The recovery of this method was in excess of 95% as determined by the addition of known amounts of GAG standards to urine samples.

Analysis of glycosaminoglycans

Total GAG purified from urine specimens was quantitated as hexuronic acid by a carbazole method, as previously described [5] using D-glucuronic acid lactone (Sigma, St. Louis, MO, USA) as the standard. The urinary concentration of total GAG was expressed as micrograms of hexuronic acid per milligram of urinary creatinine.

Identification of the different sulfated GAG species was done by electrophoresis on 0.5% agarose gel in 50 mM 1,3-diaminopropan (Merck, Darmstadt, Germany) buffer, pH 9.0, of the total GAG preparation coupled with specific degradations with chondroitin-lyases (Sigma), as described in detail elsewhere [13]. Gel slabs were digitized on a flatbed scanner and GAG bands in the digital images were quantitated using ImageJ version 1.41 software (NIH, Bethesda, MD, USA). The relative contents of the

individual GAG species were expressed as percent of total sulfated GAG.

Other analyses

Urine samples were tested with dipsticks (Multistix 10G, Bayer, Tarrytown, NY, USA) for leucocytes, erythrocytes, pH, density, total protein, and glucose. Urinary creatinine was determined by an automated enzyme assay (Sera-Pack, Bayer).

Statistics

Each of the daily urine specimens was analyzed separately, and a mean GAG concentration value was then calculated for first (days 6, 7, and 8) and second (days 20, 21, and 22) halves of the menstrual cycle. An average value for the whole cycle was also calculated using individual results from the two halves.

Results for each biochemical parameter were analyzed by one-way ANOVA followed by pairwise multiple comparisons using the Bonferroni method or the *F* test. Urinary GAG values for the first and second halves of the menstrual cycle were analyzed by a two-tailed paired *t* test.

All results are given as means \pm their standard deviations (SD), and statistical significance was considered when $p < 0.05$.

Results

We have shown previously that urinary excretion of total GAG in young women not taking OC has a biphasic pattern, in which higher values are found in the first half of the menstrual cycle as compared to the second half [5]. Controls in the present investigation had essentially the same pattern, but in similarly aged women taking OC based on ethinyl estradiol and a progestin, a significant difference between these two phases of the cycle was not detected.

Thus, as shown in Table 1, the excretion values for the first and second halves of the cycle in women taking EE+D, EE+C, and EE+G were quite similar. Because of this, a single mean excretion value was calculated for the whole menstrual cycle for each OC group, and we compared these values against those from women not using OC. The results showed that excretion of total urinary GAG tends to be higher in women taking OC (Table 2), as demonstrated by the fact that the three OC groups as a set are different from the control group ($p < 0.01$). Comparing the individual OC groups, however, showed that only EE+C was significantly different ($p < 0.005$), with GAG excretion values that were more than twice those of women not taking OC.

The detected sulfated GAG in all urine specimens were heparan sulfate (HS), dermatan sulfate (DS), and chondroitin sulfate (CS). Quantitative analysis of these GAG species showed that, as with women not taking OC [5], values from the first half were not different from those of the second half of the menstrual cycle in each of the OC groups (not shown). These two values were therefore combined in the same way as it was done for total GAG. As shown in Table 3, the relative contents of the sulfated GAG species were quite similar among women taking the different OC. However, when compared with values from women not under treatment, the three OC produced marked changes in the composition of sulfated GAG, with decreases of about 50% in HS ($p < 0.02$) and DS ($p < 0.02$), and a nearly 100% increase in CS ($p < 0.004$).

Discussion

The results of the present investigation shows that OC affect the concentration and composition of urinary GAG in various ways. Additionally, the overall effects of the three OC tended to be similar, because: (a) they all suppressed variation of total GAG concentration during the menstrual cycle; (b) although only EE+C significantly increased total

Table 1 Excretion of total urinary glycosaminoglycan in the first and second halves of the menstrual cycle in women taking and not taking oral contraceptives (EE+D, EE+C, and EE+G)

	No oral contraceptive	EE+D	EE+C	EE+G
Number of individuals	10	9	9	7
First half of cycle	0.446 \pm 0.171	0.776 \pm 0.551	0.833 \pm 0.419	0.634 \pm 0.202
Second half of cycle	0.374 \pm 0.166*	0.797 \pm 0.602	1.075 \pm 0.588	0.565 \pm 0.324

Concentration of total urinary GAG was determined as micrograms of hexuronic acid per milligram of creatinine, and the results are shown as mean \pm SD. Values for the first half are the average from concentrations on days 6, 7, and 8, while those for the second half are the average from days 20, 21, and 22 of the menstrual cycle. For each group, the mean concentration value for the first and second halves of the menstrual cycle were compared using paired *t* tests

*The two means are significantly different ($p < 0.001$)

Table 2 Mean excretion of total urinary glycosaminoglycan during the menstrual cycle in women taking and not taking oral contraceptives (EE+D, EE+C, and EE+G)

	No oral contraceptive	EE+D	EE+C	EE+G
Number of individuals	10	9	9	7
Mean excretion, whole cycle	0.412±0.167	0.754±0.491	0.954±0.420*	0.599±0.204

Concentration of total urinary GAG was determined as micrograms of hexuronic acid per milligram of creatinine, and results are shown as mean±SD. The mean excretion for the whole menstrual cycle was determined by first calculating, for each patient, the average from the concentrations in the first and second halves of the cycle. A mean was then calculated for the group

The four means are significantly different (one-way ANOVA, $p<0.025$). *Significantly different from the group not taking oral contraceptives (Bonferroni test, $p<0.005$). A set comprising the three contraceptive groups is significantly different from the group not taking oral contraceptives (F test, $p<0.01$)

urinary GAG concentration, there was a perceivable trend for the other two OC to produce this same effect, and a set consisting of the three OC was significantly different from controls; and (c) the three OC produced statistically the same changes in the proportions of the sulfated GAG.

Combined OC exert their contraceptive effects mainly through suppression of FSH and LH serum levels during the menstrual cycle, thereby inhibiting ovulation. OC themselves consist of different synthetic analogues of estrogen and a progestin, and the latter in addition may have antiandrogenic activity [12]. All of these hormones, or hormone analogues, may modulate the synthesis and degradation of proteoglycans in different ways, and their effects may depend not only on hormone type but also on the dose of a given hormone. For example, in postmenopausal women, estradiol increases the circulating levels of the GAG hyaluronan, whereas medroxyprogesterone acetate has an opposite effect. In this same group of women, 2 mg daily of estradiol elevated serum hyaluronan, but 4 mg had no effect [14]. Further, because of the high density of sex hormone receptors in the urinary tract [15], urinary proteoglycan metabolites should be particularly affected. Therefore, interpretation of the effects of OC on

urinary excretion of GAG depends on a complex array of endocrine events.

The three OC under study contain ethinyl estradiol in comparable amounts, but different types and doses of progestins. The composition of these three OC can nonetheless be regarded as roughly equivalent, and this view is consistent with the results of the present study showing an overall similarity of effects on urinary GAG excretion.

Because of its estrogen content, OC have also been used as a hormone replacement therapy in special hypoestrogenic states [16]. On the other hand, urinary GAG excretion is elevated in conditions where circulating estrogens are increased, such as during the menstrual cycle [5], during pregnancy [7], and in hormone replacement therapy for postmenopausal women [6]. Thus, in normal young women taking OC, this addition to the circulating level of estrogen might make up for the normal variation this hormone undergoes during the menstrual cycle, so that the difference that exists in urinary GAG from the first and second halves of the cycle [5] would be less pronounced, as shown by our results.

In normal conditions, renal filtration of GAG is small, and most of the excreted chains is thought to derive from

Table 3 Relative content of sulfated glycosaminoglycans in urine specimens from women taking and not taking oral contraceptives (EE+D, EE+C, and EE+G)

	No oral contraceptive	EE+D	EE+C	EE+G
Number of individuals	10	9	9	7
HS	57.97±13.46	30.17±11.41	33.48±17.50	30.54±7.06
DS	9.79±3.37	4.61±2.53	4.53±1.54	4.81±2.0
CS	32.18±11.80	66.61±12.65	66.34±20.76	64.65±7.46

Relative content of heparan sulfate (HS), dermatan sulfate (DS), and chondroitin sulfate (CS) was determined as percent of total sulfated GAG, and the results are shown as mean±SD. The mean content for the whole menstrual cycle was determined by first calculating, for each patient, the average from the concentrations in the first and second halves of the cycle. A mean was then calculated for the group. The content of each GAG species is significantly different among the groups (one-way ANOVA, $p<0.001$). Pairwise comparisons using the Bonferroni method show that, for each oral contraceptive group, the content of HS, DS, and CS is significantly different ($p<0.02$, $p<0.02$, and $p<0.004$, respectively) from that of the corresponding GAG species in the group not taking this treatment

normal proteoglycan turnover that takes place locally in the glomerulus and along the urinary tract [17]. In these tissues, proteoglycans are first degraded by matrix metalloproteinases, followed by the intracellular depolymerization of the resulting free GAG chains by lysosomal enzymes [2]. The effects of estrogen on proteoglycan metabolism include not only the inhibition of the synthesis of extracellular matrix molecules by mesenchymal cells [18] but also the direct upregulation of the expression of proteoglycan/GAG-degrading enzymes [19]. Collectively, these effects should increase degradation of proteoglycans and the production of metabolites thereof. Thus, exertion of these effects on the urinary tract are consistent, at least in part, with the increased excretion of GAG in women taking OC.

In an experiment with ovariectomized rats, de Deus and colleagues [3] showed that the concentration of total GAG in the bladder wall was decreased by 40% and the proportions of sulfated GAG were changed. Treatment of animals with either an estrogen or a progestin had little or no effect on these changes. However, when the two hormones were combined, the concentration and composition of vesical wall GAG were fully restored. These findings imply that the combined hormones act synergistically as potent promoters of proteoglycan synthesis in the bladder wall. As the treatment protocol in that investigation approximately mimics a combined OC, one can speculate that this medication leads to an enhanced accumulation of proteoglycans in the bladder wall. Further, in humans, there is a strong immunohistochemical labeling for chondroitin sulfate in the vesical wall, especially in the urothelium [20]. Insofar as proteoglycan turnover in the urinary tract is the main source of urinary GAG [17], the findings of these studies provide further support for an involvement of OC with increased total GAG excretion and elevated chondroitin sulfate urinary content, as shown by our results.

Modulation of proteoglycan turnover by FSH and LH is mostly related to the ovulatory process and include increased expression of the chondroitin sulfate proteoglycan versican in corpora lutea [21] and of heparan sulfate-degrading heparanases during follicular rupture [22]. Additionally, the progestins used in OC, such as drospirenone and cyproterone, have antiandrogenic effects [12], and in the rat uterus, androgens lead to pronounced changes in the proportions of GAG [23]. However, little is known on the effects of FSH, LH, and androgens on the urinary tract. Still, because of their various effects on ovarian and uterine proteoglycans, the suppressed levels of these hormones under OC therapy may have an impact on proteoglycan turnover and may be implicated in one or more changes in urinary GAG as described herein.

Frequent causes of pelvic pain in women include endometriosis and interstitial cystitis [24]. The pathophysiology of endometriosis has a clear hormonal basis, and

recent clinical data shows that OC are effective for the treatment of pelvic pain associated with this disease [25]. Although not yet clearly understood, the pelvic pain due to interstitial cystitis is thought to be related to a defective urothelial coating whose GAG components would be modified or even lost [20, 26]. Consequently, urinary compounds would infiltrate into the vesical wall and trigger inflammatory reactions and/or nerve stimulation that would ultimately account for most of the clinical manifestations of interstitial cystitis [28, 29]. One of the main treatments for this disease is, in fact, the oral or topical administration of GAG or GAG-like compounds, which presumably restores the urothelial coating [27]. Interestingly, there is evidence, although limited to a few patients, that OC therapy improves symptoms in women suffering from interstitial cystitis [28], a finding which, again, is consistent with our results.

A higher urinary GAG content is also known to protect the urinary tract against infection [9]. As our results showed that OC use increases urinary GAG concentration, one would expect that women under this therapy would be less susceptible to urinary tract infections. However, experimental evidence shows that this is not the case because OC use may actually be a risk factor for urinary infection in young women [29]. A possible explanation for these discrepant data is that OC use is also associated with other changes in the urinary tract, such as altered epithelium and lower blood flow, that favor infection [30]. Urolithiasis is another disorder that may be prevented by higher urinary GAG excretion [8, 11]. Even though no correlation has been done yet on OC use and the incidence of urinary tract stones, this is nonetheless a potential health benefit of OC use in view of our results.

The above discussed protective effects of GAG are mainly due to specific interactions between these poly-anions and other molecules or cell surfaces. The affinity of this interaction may vary though, and depend on structural features of the GAG chain, such as charge density [13]. Typically, charge density of HS is lower, while that of CS is higher [13]. According to our results, in women taking OC, the urinary content of HS is decreased, while that of CS is nearly doubled. Thus, these changes, together with the increase in total GAG, indicate that OC therapy might enhance the protective effects of urinary GAG.

In spite of the statistical significance of our findings, and of the high demographic homogeneity of the groups of women, a study of the effects of OC on urinary GAG should benefit from a larger sample of urine donors. This might show, for example, that urinary excretion of total GAG is increased in women taking other OCs, in addition to those shown herein. It might also show that the three OC we analyzed affect similarly, and significantly, total urinary GAG excretion. In the present study, we investigated one

delivery system and the most commonly used formulations of hormonal contraceptives. However, and in view of the potential advantages of increased urinary GAG excretion, it would be worthwhile to determine whether other delivery systems, such as transdermal, vaginal, implantable, and injectable, affect GAG excretion as well. It has been shown recently, for example, that oral and transdermal hormone replacement therapy in postmenopausal women have different effects on the serum levels of hyaluronan [14]. In the present investigation, we showed that combined OC currently and widely used as a birth control method may have additional health benefits related to altered urinary GAG excretion. On the other hand, combined OC contain an estrogen and a progestin, which themselves have different, opposite, and even synergistic effects on proteoglycan turnover, as discussed herein. Thus, a more accurate knowledge about these effects would require experiments in which the individual hormones are tested separately.

In conclusion, this study showed that commonly used combined OC increase the content and modify the composition of urinary of GAG. These molecules have protective effects against urinary tract disorders such as urolithiasis and interstitial cystitis, and the altered excretion pattern resulting from OC use might enhance these beneficial effects.

Conflicts of interest None.

Funding Supported by grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), and Council for Improvement of Graduated Students (CAPES), Brazil.

References

- Bishop JR, Schuksz M, Esko JD (2007) Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446:1030–1037
- Verma RP, Hansch C (2007) Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* 15:2223–2268
- de Deus JM, Girão MJ, Sartori MG, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Nader HB, Dietrich CP (2003) Glycosaminoglycan profile in bladder and urethra of castrated rats treated with estrogen, progesterone, and raloxifene. *Am J Obstet Gynecol* 189:1654–1659
- Tanaka K, Nakamura T, Takagaki K, Funahashi M, Saito Y, Endo M (1997) Regulation of hyaluronate metabolism by progesterone in cultured fibroblasts from the human uterine cervix. *FEBS Lett* 402:223–226
- Maroclo MV, Pereira SD, Sampaio FJ, Cardoso LE (2005) Urinary glycosaminoglycan excretion during the menstrual cycle in normal young women. *J Urol* 173:1789–1792
- Brollo J, Maroclo M, Sampaio F, Cardoso L (2006) Urinary glycosaminoglycan excretion in postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Eur Urol Suppl* 5:40
- Maroclo M, Cabral C, Pereira S, Sampaio F, Cardoso L (2006) Excretion of urinary glycosaminoglycans during normal pregnancy and puerperium in young women. *Eur Urol Suppl* 5:41
- Boevé ER, Cao LC, Verkoelen CF, Romijn JC, de Bruijn WC, Schröder FH (1994) Glycosaminoglycans and other sulphated polysaccharides in calculogenesis of urinary stones. *World J Urol* 12:43–48
- Stabellini G, Calastrini C, Gilli P, Bedani PL (1999) Urinary glycosaminoglycans in recurrent urinary tract infections in kidney transplant patients. *Biomed Pharmacother* 53:274–277
- Wei DC, Politano VA, Selzer MG, Lokeshwar VB (2000) The association of elevated urinary total to sulfated glycosaminoglycan ratio and high molecular mass hyaluronic acid with interstitial cystitis. *J Urol* 163:1577–1583
- Gohel MD, Shum DK, Tam PC (2007) Electrophoretic separation and characterization of urinary glycosaminoglycans and their roles in urolithiasis. *Carbohydr Res* 342:79–86
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine (2008) Hormonal contraception: recent advances and controversies. *Fertil Steril* 90(5 Suppl):S103–S113
- Cardoso LEM, Mourao PAS (1994) Glycosaminoglycan fractions from human arteries presenting diverse susceptibilities to atherosclerosis have different binding affinities to plasma low density lipoproteins. *Arterioscler Thromb* 14:115–124
- Tuomikoski P, Aittomäki K, Mikkola TS, Ropponen A, Ylikorkala O (2008) Effect of oral and transdermal hormone therapy on hyaluronic acid in women with and without a history of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 198:375.e1–375.e5
- Batra SC, Iosif CS (1987) Progesterone receptors in the female lower urinary tract. *J Urol* 138:1301–1304
- Chen EC, Brzycki RG (1999) Exercise and reproductive dysfunction. *Fertil Steril* 71:1–6
- Lee EY, Kim SH, Whang SK, Hwang KY, Yang JO, Hong SY (2003) Isolation, identification, and quantitation of urinary glycosaminoglycans. *Am J Nephrol* 23:152–157
- Barchiesi F, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Fingerle J, Dubey RK (2002) Methoxyestradiols mediate estradiol-induced antimitogenesis in human aortic SMCs. *Hypertension* 39:874–879
- Xu X, Ding J, Rao G, Shen J, Prinz RA, Rana N, Dmowski WP (2007) Estradiol induces heparanase-1 expression and heparan sulphate proteoglycan degradation in human endometrium. *Hum Reprod* 22:927–937
- Slobodov G, Feloney M, Gran C, Kyker KD, Hurst RE, Culkun DJ (2004) Abnormal expression of molecular markers for bladder impermeability and differentiation in the urothelium of patients with interstitial cystitis. *J Urol* 171:1554–1558
- Richards JS (2005) Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol* 234:75–79
- Klipper E, Tatz E, Kisliouk T, Vlodavsky I, Moallem U, Schams D, Lavon Y, Wolfenson D, Meidan R (2009) Induction of heparanase in bovine granulosa cells by luteinizing hormone: possible role during the ovulatory process. *Endocrinology* 150:413–421
- Ji H, Dailey TL, Long V, Chien EK (2008) Androgen-regulated cervical ripening: a structural, biomechanical, and molecular analysis. *Am J Obstet Gynecol* 198:543.e1–543.e9
- Ortiz DD (2008) Chronic pelvic pain in women. *Am Fam Physician* 77:1535–1542
- Harada T, Momoeda M, Taketani Y, Hoshiai H, Terakawa N (2008) Low-dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Fertil Steril* 90:1583–1588

26. Hauser PJ, Dozmorov MG, Bane BL, Slobodov G, Culkin DJ, Hurst RE (2008) Abnormal expression of differentiation related proteins and proteoglycan core proteins in the urothelium of patients with interstitial cystitis. *J Urol* 179:764–769
27. Parsons CL (2007) The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis. *Urology* 69(4 Suppl):9–16
28. Lentz GM, Bavendam T, Stenchever MA, Miller JL, Smallbridge J (2002) Hormonal manipulation in women with chronic, cyclic irritable bladder symptoms and pelvic pain. *Am J Obstet Gynecol* 186:1268–1271
29. Finer G, Landau D (2004) Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. *Lancet Infect Dis* 4:631–635
30. Pinggera GM, Feuchter G, Frauscher F, Rehder P, Strasser H, Bartsch G, Herwig R (2005) Effects of local estrogen therapy on recurrent urinary tract infections in young females under oral contraceptives. *Eur Urol* 47:243–249