Priscila Cristina Andrade

**Estudo temporal dos colágenos (I, III, IV e V) e produtos de glicação
avançada na sinóvia em modelo experimental de diabetes em ratos**

**São Paulo
2018**

Priscila Cristina Andrade

**Estudo temporal dos colágenos (I, III, IV e V) e produtos de glicação
avançada na sinóvia em modelo experimental de diabetes em ratos**

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

Programa de Fisiopatologia experimental
Orientadora: Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Andrade, Priscila Cristina

Estudo temporal dos colágenos (I, III, IV e V) e produtos de glicação avançada na sinóvia em modelo experimental de diabetes em ratos / Priscila Cristina Andrade. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.Colágeno 2.Diabetes mellitus experimental 3.Líquido sinovial 4.Membrana sinovial 5.Transtornos da articulação 6.Células endoteliais 7.Produtos finais de glicação avançada

USP/FM/DBD-069/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

DEDICATÓRIA

Dedico esta vitória a minha família e amigos, base para qualquer caminhada e suporte para toda dor que enfrentamos e certamente enfrentaremos.

Inicialmente só posso dedicar à estrela mais linda do céu, minha eterna bisavó Idalina Peraro, que nos deixou há tão pouco tempo, e seria a pessoa mais orgulhosa nesta apresentação. Vó dedico minha tese e maneira de pensar a senhora. Agradeço a forma que me ensinou a amar e respeitar o próximo, aprendi que devemos manter a doçura frente a vida, pois esta é única e merece ser vivida intensamente, espero formar uma família linda como a senhora formou, e se estes me amarem um terço do quanto foi amada eu já me sentirei realizada. Sua sabedoria era infinitamente maior que a minha, sinto por não poder aprender mais, porém carregarei no meu coração todos seus ensinamentos e aquela sensação do abraço forte a cada chegada minha. Por fim, muito obrigada por ter criado minha mãe tão lindamente, por ter sido a mãe mais presente para seus netos mesmo depois de ter perdido sua filha tão precocemente, o amor deve sempre ser maior que a dor...aprendi. Amor e saudade eterna, da sua bisneta agora doutora, como à senhora sempre sonhou.

Dedico e agradeço a minha mãe Sandra Antonieta por toda bravura de uma vencedora da vida, sangue italiano, de uma honra e honestidade raros neste mundo, um coração capaz de doar tudo que tem, um exemplo de perseverança que voou tão alto quanto um passarinho, mesmo vindo de um lugar sem qualquer perspectiva. Tenho tanto orgulho da mãe que tenho que dedicar nem seria o suficiente, agradecer imensamente e sentir muita gratidão a Deus por ter me abençoado como sua filha talvez seja o mínimo. Sei o quanto este título é importante e lhe traz orgulho, então ele é tão seu quanto meu. Que eu possa ter por perto por muitas décadas, ainda preciso aprender demais sobre a vida e agora será minha melhor amiga e professora. Te amo infinitamente.

Ao meu pai agradeço por fazer parte das melhores e mais divertidas memórias de infância, por me ensinar a não levar tão a sério os contratempos e valorizar outras partes importantes da vida, além das obrigações. Viajar sempre foi seu lema. Mesmo distante saiba que só por ser meu pai já me deu o mais importante, a vida.

Para minha irmã caçulinha eu dedico todo o amor desta vida. Agradeço por cuidar de mim, por ser até mais velha que eu em certos pontos! Agradeço a amizade e paciência que tem com meus muitos defeitos. Esta e todas as minhas vitórias sempre terão suas mãos. Ninguém vence sozinho. Nossas imitações do maluco do pedaço serão eternas. Rs.

Dedico aos demais familiares, que todos se sintam representados e abraços por mim. Estive ausente em vários momentos para me dedicar a este trabalho e sempre me entenderam perfeitamente, com muito carinho e apoio.

Dentre as pessoas que amo e que considero da família escolho uma em especial para agradecer e dedicar este momento. Larissa Gadelha, muito obrigada por estar em nossas vidas, por todos os cuidados com minha avó, mãe e a mim no momento mais difícil que enfrentamos. Aquela dedicação e amor sem interesse, por todo cuidado médico e afetuoso que fez a minha avó serei eternamente grata.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente por ter me oferecido o dom da vida, e principalmente por ter me presenteado com a melhor mãe do mundo.

A minha atenciosa orientadora Profa. Dra. Vera Capelozzi, por aceitar ser minha orientadora e ter me dado à oportunidade de aproveitar seus conhecimentos inquestionáveis e experiências, muito obrigada por todo carinho, respeito que sempre me atendeu quando solicitei.

A minha querida Profa. Dra. Walcy Teodoro Rosolia, a qual eu não tenho palavras para descrever o quanto sou imensamente e eternamente grata, pois foi a primeira pessoa a me abrir as portas nesta instituição renomada, realizando um sonho que eu tinha a muito tempo, e que no momento certo Deus me permitiu realizar através de suas bondosas e gentis mãos, mãos estas que estavam sempre prontas a me ensinar, ajudar e acolher quando necessitei, me ajudou a evoluir quanto pessoa e profissional e deixou de ser simplesmente minha orientadora, para hoje ser uma grande amiga que levarei sempre em meu coração.

A adorável Dra Ana Paula Pereira Velosa, por ter me mostrado além de seus conhecimentos, a representação de bondade e paciência, sempre gentil em suas ações e palavras, pronta a ajudar a todos em qualquer ocasião, colocando por muitas vezes a própria vida pessoal em segundo plano para atender aqueles que assim como eu precisaram, muito obrigada por me mostrar que a esperança em pessoas boas ainda deve existir, simplesmente te defino como um exemplo a ser seguido, uma grande amiga e pessoa que poucos tem a oportunidade de conhecer.

A Sandra Aparecida Atayde, a qual eu não poderia deixar de agradecer, pois me apresentou a estas pessoas e me deu a oportunidade de ingressar nesta instituição, e me deu a possibilidade de um novo horizonte.

A Silvana Atayde, por ter se tornado muito presente no meu dia a dia, sempre alegre, simpática e atenciosa com sua amizade, cuidadosa com minha alimentação e saúde, solicita em qualquer ocasião. Uma grande amiga que levarei pra vida e que posso contar sempre.

Ao Dr. Edwin Roger Parra, sempre presente, pela sua amizade e por seu auxílio na aquisição e interpretação dos dados deste trabalho.

A Denise Frediane, que com sua ajuda pronta e imediata assim que solicitei permitiu que eu conseguisse desenvolver partes deste trabalho, muito obrigada por preciosa atenção e carinho ao me receber.

Aos pesquisadores Sérgio Catanozi, Antônio Santos Filho, pelos ensinamentos particulares que cada área, por toda ajuda nos momentos que precisei e por todo o respeito e carinho que me receberam quando solicitei.

A Paula, por ter me atendido, mesmo em prazo apertado, sempre com sorriso no rosto e uma palavra positiva, por toda dedicação e palavras de apoio.

À Isabele Brindo da Cruz por toda a ajuda, amizade, paciência em ouvir minhas lamentações nos momentos difíceis, carinho em suas palavras de apoio, uma grande amiga que se tornou muito importante em meu dia a dia.

A Maristela Peres Rangel, por ser definitivamente uma grande e maravilhosa surpresa, não tem palavras para descrever o quanto fiquei imensamente feliz por ter descoberto neste momento tão decisivo uma amiga pronta a ajudar, agradeço o apoio, as palavras de incentivo, a amizade oferecida quando mais precisei.

A Natalia Colombo, sempre alguém que posso contar, muito obrigada por sua amizade sincera, e por seus conselhos sempre pertinentes e que me ajudaram a crescer profissionalmente e como pessoa.

Aos amigos de laboratório Marcelo, Natália Borsonello, Vanessa Carioca, Adriana Marcelino pelo companheirismo e pela ajuda em vários procedimentos laboratoriais.

Às meninas tão queridas, Maria Aparecida A. Ferraz, Juraci Pereira, Vilma Alves e Ângela Maria de Souza por toda ajuda e cumplicidade.

À Sandra Fernezlian, pela padronização e realização das reações de imunohistoquímica, por sempre me atender prontamente e com muito carinho, mesmo em meio a grandes tempestades.

Agradeço a todos mesmo aqueles que não pude lembrar, mas que fizeram parte de minha trajetória acadêmica.

“O segredo do sucesso é a constância do propósito.”

Benjamin Disraeli

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Produto de glicação avançada
BSA	Soro de albumina bovina
cDNA	DNA Complementar
COLI	Colágeno tipo I
COLIII	Colágeno tipo III
COLV	Colágeno tipo V
COL5A1	Gene do colágeno tipo V cadeia alfa 1
COL5A2	Gene do colágeno tipo V cadeia alfa 2
COOH	Região carboxi terminal
CTGF	Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ET1	Endotelina-1
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IL	Interleucina
H&E	Hematoxilina e Eosina
IL-6	Interleucina-6
IL-17	Interleucina-17
MEC	Matriz extracelular
mm	Milímetro
mM	Mili molar
NH ₂	Região amino terminal
nm	Nanômetro
RAGE	Receptor de AGE
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA Mensageiro
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação de Cadeia em polimerase

TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
α_1	Cadeia alfa 1
α_2	Cadeia alfa 2
μm	Micrômetro
μl	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Representação dos valores glicêmicos e os critérios de diagnóstico de diabetes.....	3
Figura 2 -Diagrama demonstrando a fisiopatologia da doença cardiovascular no diabético.....	6
Figura 3 - Efeitos do AGEs. Ciclo da divisão celular da proteína	7
Figura 4 - Representação do tecido sinovial e seus componentes na estrutura articular do joelho.....	9
Figura 5 -Representação das subunidades do colágeno.....	11
Figura 6 - Pontes intra e intermoleculares dos colágenos fibrilares.....	12
Figura 7 - Diagrama esquemático mostrando a biossíntese dos colágenos fibrilares.....	13
Figura 8 - Representação esquemática do arranjo de moléculas de tropocolágeno em estruturas fibrilares e de fibrilas.....	14
Figura 9 - Glicosilação não enzimática de proteínas em seres humanos.....	15
Figura 10 -Representação esquemática da estrutura do receptor RAGE	16
Figura 11 -Imagem representativa do método estereológico de contagem de pontos por meio de um retículo adaptado a microscópio convencional.....	25
Figura 12 - Imagem representativa da análise de imagens pelo <i>softwareImage-Pro Plus</i>	26
Figura 13 - Imagem representativa da análise de imagens pelo <i>softwareImage-Pro Plus</i> 6.043.....	30
Figura 14 - Imagem representativa da análise de imagens pelo <i>softwareImage-Pro Plus</i> 6.0.....	32
Figura 15 -Imagem representativa do método estereológico de contagem de pontos por meio de um retículo adaptado a microscópio convencional.....	34
Figura 16 -Cortes histológicos do tecido sinovial corados com H&E.....	42

Figura 17 -Cortes histológicos do tecido sinovial corados com hematoxilinaeosina	44
Figura 18 - Cortes histológicos do tecido sinovial corados com Picrosirius.....	46
Figura 19 -Cortes histológicos do tecido sinovial corados com Picrosirius.....	48
Figura 20 – <i>Box Plot</i> mostrando a porcentagem de fibras grossas e finas na membrana sinovial de ratos diabéticos em relação a seu respectivo controles	50
Figura 21 – <i>Box Plot</i> mostrando a porcentagem de fibras grossas e finas do compartimento sub sinovial de ratos diabéticos em relação ao respectivo controle.....	51
Figura 22 – <i>Box Plot</i> mostrando a porcentagem de fibras grossas e finas nos vasos sinovial de ratos diabéticos em relação ao respectivo controle.....	52
Figura 23. Cortes histológicos do tecido sinovial corados com Picrosirius (A-F), sob luz polarizada.....	55
Figura 24. Cortes histológicos do tecido sinovial corados com Picrosirius (A-F) sob luz polarizada.....	57
Figura 25 – <i>Box Plot</i> mostrando a porcentagem de fibras grossas e finas no tecido sinovial de ratos diabéticos em relação ao controle.....	59
Figura 26 – <i>Box Plot</i> mostrando a porcentagem de fibras grossas e finas do vaso sinovial de ratos diabético em relação ao controle.....	60
Figura 27. Imunofluorescência do tecido sinovial de rato imunomarcado com anti-colágeno I.....	64
Figura 28 – <i>Box Plot</i> sobre porcentagem da expressão da fibra de colágeno tipo I, na sinóvia de ratos diabéticos e controle.....	65
Figura 29. Imunofluorescência na sinóvia de rato, imunomarcada com anti-colágeno III.....	67
Figura 30 – <i>Box Plot</i> sobre porcentagem da expressão da fibra de colágeno tipo III, na sinóvia de ratos diabéticos e controle.....	68
Figura 31 Imunofluorescência no tecido sinovial de ratos imunomarcado com anti-colágeno V.....	70
Figura 32 – <i>Box Plot</i> sobre porcentagem da expressão da fibra de colágeno tipo V, na sinóvia de ratos diabéticos e controle.....	71

Figura 33 – <i>Box Plot</i> mostrando a porcentagem de 4-hidroxiprolina no tecido sinovial do grupo diabético em relação ao grupo controle correspondente.....	73
Figura 34. Imunofluorescência do tecido sinovial de rato imunomarcada com anti-RAGE.....	76
Figura 35. Imunofluorescência do tecido sinovial de rato imunomarcada com anti-CML.....	76
Figura 36 <i>Box Plot</i> sobre a porcentagem da expressão do RAGE na sinóvia de ratos diabéticos e controle.....	77
Figura 37 – <i>Box Plot</i> sobre porcentagem da expressão da CML, na sinóvia de ratos diabéticos e controle.....	78
Figura 38 .Expressão de endotelina-1 no endotélio vascular da sinóvia dos animais controle.....	80
Figura 39. Cortes histológicos do tecido sinovial de rato imunomarcado com anti-tgf- β	82
Figura 40. Imunomarcção do tecido sinovial de rato com TGF- β	84
Figura 41 – <i>Box Plot</i> sobre a porcentagem de TGF- β expesso no tecido sinovial de ratos diabéticos e controles.....	85
Figura 42 – <i>Box Plot</i> representando a porcentagem de TGF- β expesso no vaso sinovial de ratos diabéticos e controles.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Anticorpos utilizados em imunofluorescência.....	29
Tabela 2 - Anticorpos utilizados em imunomarcção.....	31
Tabela 3 -Anticorpos utilizados em imunohistoquímica.....	33
Tabela 4 -.Sequência e descrição dos genes selecionados para o estudo.....	36
Tabela 5 -Características gerais dos grupos diabéticos e controle após administração de estreptozotocina.....	39
Tabela 6 - Morfometria do colágeno total presente na membrana sinovial de ratos diabéticos e controle.....	49
Tabela 7 - Morfometria do colágeno total presente no compartimento sub sinovial de ratos diabéticos e controle.....	49
Tabela 8 - Morfometria do colágeno total presente nos vasos sinoviais de ratos diabéticos e controle.....	49
Tabela 9 - Porcentagem de colágeno de fibras finas e grossas no tecido sinovial de ratos diabéticos e controle.....	58
Tabela 10 - Porcentagem de colágeno de fibras finas e grossas no vaso sinovial de ratos diabéticos e controle.....	58
Tabela 11 - Quantificação da expressão da fibra de colágeno tipo I na sinóvia de ratos diabéticos e controle.....	65
Tabela 12 -Quantificação referente a expressão das fibras de colágeno tipo III, após imunomarcção do tecido sinovial de ratos diabéticos e controle.....	68
Tabela 13 - Quantificação referente a expressão das fibras de colágeno tipo V, após imunomarcção do tecido sinovial de ratos diabéticos e controle.....	71
Tabela 14 - Quantificação da 4-hidroxiprolina presente no tecido sinovial de ratos diabéticos e controle.....	73
Tabela 15 - Quantificação referente à expressão do receptor de AGE após imunomarcção do tecido sinovial de ratos diabéticos e controle.....	77

Tabela 16 - Quantificação referente à expressão da CML, após marcação do tecido sinovial de ratos diabéticos e controle.....78

Tabela 18 - Quantificação da expressão do TGF- β no tecido sinovial em ratos diabéticos e controle.....85

Tabela 19 - Quantificação da expressão do TGF- β no tecido sinovial em ratos diabéticos e controle.....86

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 -Quantificação por RT-PCR em tempo real dos genes das cadeias α dos colágenos I obtidos do tecido sinovial de ratos diabéticos e controles..... 87

Gráfico 2 -Quantificação por RT-PCR em tempo real dos genes das cadeias α dos colágenos I obtidos do tecido sinovial de ratos diabéticos e controles.....88

Gráfico 3 - Quantificação por RT-PCR em tempo real dos genes das cadeias α dos colágenos I obtidos do tecido sinovial de ratos diabéticos e controles.....88

RESUMO

Andrade PC. *Estudo temporal dos colágenos (I, III, IV e V) e produtos de glicação avançada na sinóvia em modelo experimental de diabetes em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: Diabetes Mellitus é caracterizada por hiperglicemia crônica, e este aumento excessivo de glicose circulante pode gerar danos vasculares e microvasculares pela deposição de produtos de glicação avançada (AGE), principalmente em estruturas com alta vascularização, como é o caso da sinóvia. Por todas estas razões, o presente estudo estabeleceu, de maneira temporal, o processo de acometimento sinovial, através do grau de remodelamento e as proteínas envolvidas neste processo, tido como o gatilho na lesão da articulação do joelho. Foram utilizados ratos wistar (n=60), divididos em três grupos, conforme tempo de indução (7, 30 e 60 dias), cada grupo era composto de 10 animais diabéticos, induzido por estreptozotocina (35mg/kg de peso) e 10 animais controle, recebendo infusão do mesmo volume de solução salina, após o tempo estipulado os animais foram sacrificados e a sinóvia coletada para as análises propostas. Análise morfológica através de colorações de hematoxilina-eosina para análise do perfil celular do tecido sinovial e Picrosírius para avaliação da histoarquitetura das fibras colágenas. A quantificação das fibras colágenas foi realizada pela coloração do Picrosírius em microscópio de luz polarizada e a caracterização e distribuição de seus tipos por imunofluorescência, para quantificação total da proteína de colágeno foi realizado a medição da 4-hidroxiprolina (HPO). Os produtos de glicação avançada foram analisados e quantificados por imunofluorescência. A detecção e quantificação da imunoexpressão de marcadores bioquímicos como ET-1, TGF-B e IL17 foi realizado por método estereológico de contagem de pontos em retículo, e como método de confirmação dos achados imunohistoquímicos foi realizado análise de expressão gênica dos Colágenos I,III, e V alfa-1, alfa-2), por Reação de Transcrição Reversa com amplificação por PCR em Tempo Real (qRT-PCR). Resultados: Foi observado modificação da estrutura sinovial de forma temporal, acometendo inicialmente os vasos subsinoviais e tecidos adjacentes a ele, isso foi observado em tanto em análise morfológica como confirmado em quantificação por Picro em luz polarizada, as modificações se mostraram significantes nos grupos de 30 e 60 dias, quando comparado ao respectivo grupo controle, houve aumento do colágeno total, através do Picrosirius, como por dosagem de HOP. Os resultados foram confirmados por imunofluorescência com o aumento progressivo do COLI e diminuição de COLIII e COLV, o RAGE e AGE também tiveram sua expressão aumentada conforme a evolução no tempo de indução dos animais. Em análise da expressão de outras proteínas foi possível observar a detecção da ET-1 e da IL-17 nos animais diabéticos em comparação ao controle, houve também expressão significativa do TGF-B quando comparado ao respectivo controle. Na análise da expressão gênica foi possível observar aumento do COLV inicialmente, principalmente da cadeia alfa 2, do COLIII e COLI, confirmando achados histomorfométricos. Conclusão: O tecido sinovial demonstra remodelamento precoce ao redor dos vasos, essa mediação envolve o COL1 e os produtos de glicação avançada. Esta alteração no tecido sinovial pode ser responsável por desencadear o acometimento articular no diabetes mellitus.

Descritores: colágeno; diabetes mellitus experimental; líquido sinovial; membrana sinovial; transtornos da articulação; células endoteliais; produtos finais de glicação avançada.

ABSTRACT

Andrade PC. *Study of temporal collagens (I, III, IV and V) and advanced glycation end products synovium in experimental model of diabetes in rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Introduction: Diabetes Mellitus is characterized by chronic hyperglycemia, and this excessive increase of circulating glucose can cause vascular and microvascular damage by the deposition of advanced glycation products (AGE), especially in structures with high vascularization, as is the case of synovium. For all these reasons, the present study established, in a temporal way, the process of synovial concomitance, through the degree of remodeling and the proteins involved in this process, considered as the trigger in the lesion of the knee joint. Wistar rats (n = 60), divided into three groups, according to induction time (7, 30 and 60 days), each group consisted of 10 diabetic animals, induced by streptozotocin (35 mg / kg body weight) and 10 animals control, receiving infusion of the same volume of saline solution, after the stipulated time the animals were sacrificed and the synovium collected for the proposed analyzes. Morphological analysis using hematoxylin-eosin staining for analysis of the cellular profile of the synovial tissue and Picrosírius for evaluation of the histoarchitecture of the collagen fibers. The quantification of the collagen fibers was performed by the Picrosírius staining in a polarized light microscope and the characterization and distribution of its types by immunofluorescence, the measurement of 4-hydroxyproline (HPO) was performed for the total quantification of the collagen protein. Advanced glycation products were analyzed and quantified by impuluoescence. The detection and quantification of the immunoexpression of biochemical markers such as ET-1, TGF-B and IL17 was performed by stereological method of reticule dot counting, and as a method of confirming the immunohistochemical findings, the analysis of the collagen I, III , and V alpha-1, alpha-2), by Reverse Transcription Reaction with Real-Time PCR Amplification (qRT-PCR). **Results:** Modification of the synovial structure was observed temporally, initially affecting subsynovial vessels and tissues adjacent to it, this was observed in both morphological analysis and confirmed in quantification by Picro in polarized light, the modifications were significant in the groups of 30 and 60 days, when compared to the respective control group, there was increase of the total collagen, through Picrosirius, as per HOP dosage. The results were confirmed by immunofluorescence with progressive increase of COLI and decrease of COLIII and COLV, RAGE and AGE also had their expression increased as the evolution in the induction time of the animals. In the analysis of the expression of other proteins it was possible to observe the detection of ET-1 and IL-17 in diabetic animals in comparison to the control, there was also significant expression of TGF-B when compared to the respective control. In the analysis of the gene expression it was possible to observe an increase of the COLV initially, mainly of the alpha 2 chain, of the COLIII and COLI, confirming histomorphometric findings. **Conclusion:** Synovial tissue demonstrates early remodeling around vessels, this mediation involves COL1 and advanced glycation products. This change in synovial tissue may be responsible for triggering joint involvement in diabetes mellitus.

Descriptors: collagen; diabetes mellitus, experimental; synovial fluid; synovial membrane; articulation disorders; advanced glycation end products.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Gráficos	xvi
Resumo	xvii
Summary	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Conceitos gerais de Diabetes Mellitus	2
1.2 Patologia e Patogênese	4
1.2.1 Complicações Microvasculares	6
1.3 Comprometimento articular no DM	8
1.4 Sinóvia	8
1.5 Colágeno	10
1.6 RAGE e AGE	15
1.7 Endotelina	17
1.8 TGF- β	18
1.9 Modelo experimental	18
2.OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Especificos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Desenvolvimento do modelo experimental	23
3.1.1. Animais	23
3.1.2. Indução do diabetes	23
3.2. Microscopia Óptica	24
3.3. Avaliação do colágeno no tecido sinovial	25
3.3.1.Avaliação do colágeno total nos compartimentos sinoviais por morfometria	25
3.3.2.Avaliação do colágeno total por análise de imagem	26
3.3.3. Quantificação de Colágeno pela Dosagem da 4-hidroxiprolina	27
3.3.4. Imunofluorescência para colágeno dos tipos I, III, IV e V no tecido sinovial	28
3.3.5. Histomorformetria do colágeno dos tipos I, III, IV e V no tecido sinovial	29

3.4 Avaliação de RAGE e CML	30
3.4.1. Imunofluorescência para RAGE e CML	30
3.4.2. Histomorfometria para RAGE no tecido sinovial	31
3.5. Imunohistoquímica para detecção de TGF- β , CTGF, IL-4, IL9 E IL17	32
3.5.2. Morfometria do TGF- β	34
3.6. Reação de transcrição reversa com amplificação por PCR em tempo real	35
3.6.1. Extração de RNA	35
3.6.2. Reação em cadeia da polimerização em tempo real (qRT-PCR)	35
3.7 Análise Estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Diabetes Experimental	39
4.2 Remodelamento da Sinóvia no Diabetes Experimental	40
4.2.1. Alterações estruturais no tecido sinovial decorrem de comportamento anormal dos diferentes tipos de colágenos	40
4.2.1.1. Aumento progressivo do colágeno total nos vasos e tela sub sinovial	40
4.2.1.2. Aumento progressivo de fibras grossas do colágeno nos vasos e tela sub sinovial	53
4.2.1.3. Relação entre a expressão de fibras do colágeno I, III e V	61
4.2.2. Alterações bioquímicas e funcionais no tecido sinovial são decorrentes de comportamento anormal de colágenos e proteínas	72
4.2.2.1. Aumento do colágeno total através da 4-Hidroxiprolina	72
4.2.2.2. Aumento dos produtos de glicação e seus receptores	74
4.2.2.3. Aumento de citocinas pró-fibróticas	79
4.2.3. Alterações gênicas no tecido sinovial induzem comportamento anormal dos diferentes tipos de colágenos	87
4.2.3.1. A expressão gênica do colágeno I e III e cadeias α do colágeno V	87
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÃO	94
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	95

1.INTRODUÇÃO

1.1 CONCEITOS GERAIS DE DIABETES MELLITUS

A Diabetes Mellitus (DM) é, dentre as doenças crônicas não transmissíveis, o grande desafio do século XXI, um problema crescente que afeta a saúde mundial. Estima-se que sua prevalência dobre a cada 10 anos, havendo atualmente mais de 250 milhões de pessoas afetadas em todo o mundo^{1,2}. Só no Brasil, pesquisas recentes apontaram para um alarmante número de 12 milhões de diabéticos, acompanhando a tendência mundial, principalmente em países em desenvolvimento que somado os casos espera-se, até 2025, ultrapassar os 150 milhões de acometidos, que em sua maioria estão relacionados ao estilo de vida moderno (85%)^{3,4}.

Neste cenário mundial, as pesquisas têm se intensificado para garantir a sobrevida destes indivíduos frente as complicações graves em órgão vitais. Porém, apesar do tratamento medicamentoso ter evoluído significativamente, neste sentido, a qualidade com que envelhecem continua sendo uma problemática, principalmente devido as complicações limitantes, sintomas álgicos e parestésicos, presentes em fases descompensadas e tardias da DM. Por este motivo, estudos aprofundados sobre a etiologia destes fatores limitantes, como os que ocorrem nas articulações, são atualmente uma realidade⁵.

Por definição, DM é o nome que se dá ao grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, a própria ação da insulina, ou ambos. A hiperglicemia crônica está associada a danos em longo prazo e vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento da diabetes. Estas vão desde a destruição autoimune das células β do pâncreas, com consequente deficiência de insulina, até anormalidades que resultam da resistência à ação da mesma^{6,7}.

A base das anormalidades no metabolismo de carboidratos, lípedes e proteínas, resultam da ação deficiente da insulina nos tecidos alvo. As alterações decorrentes da secreção inadequada de insulina e/ou respostas teciduais diminuídas estabelecem pontos complexos sobre a ação deste hormônio, e frequentemente coexistem no mesmo paciente, porém o efeito sempre é a hiperglicemia.^{4,5,6}

Baseado neste conceito, atualmente esta síndrome é classificada incorporando seus estágios clínicos, desde a normalidade, passando para a tolerância à glicose diminuída, ou também glicemia de jejum alterada, até o DM propriamente dito.⁸ Essa classificação se baseia na etiologia do DM, abandonando os termos DMID (Diabetes Mellitus dependente de insulina) e DMNID (Diabetes Mellitus não dependente de insulina), sendo os tipos mais comuns o tipo 1(DM1) e tipo 2(DM2)^{6,7}.

O DM1 resulta, primariamente, da destruição das células β pancreáticas e consequente deficiência absoluta da secreção de insulina, tendendo à cetoacidose e estresse oxidativo. Os indivíduos com maior risco de desenvolver este tipo de DM, geralmente, podem ser identificados por evidência sorológica de um processo patológico autoimune que ocorre nas ilhotas pancreáticas e por marcadores genéticos. A forma rapidamente progressiva é comumente observada em crianças e adolescentes, porém, pode ocorrer também em adultos, e sua incidência corresponde de 5% a 10% do total de casos⁵⁻⁷.

O tipo mais comum, e que abrange de 85% a 90% do total de casos, é a DM2. De modo geral, a causa é uma combinação da resistência à ação da insulina e uma resposta compensatória inadequada deste hormônio frente à hiperglicemia. A maioria dos pacientes possui excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais, como infecções graves. O diagnóstico, na maioria dos casos, é feito a partir dos 40 anos de idade e normalmente está relacionado ao estilo de vida. Nesta última categoria, há um grau de hiperglicemia suficiente para causar alterações patológicas e funcionais em vários tecidos-alvo, mas sem sintomas clínicos por longo período antes que a diabetes seja detectada. Durante este período assintomático, é possível demonstrar uma anormalidade no metabolismo de hidratos de carbono por medição da glicose no plasma em jejum, ou após um desafio com uma carga oral de glicose. A figura 1 ilustra os estágios de diagnóstico diabético frente ao valor glicêmico⁹⁻¹¹.

CRITERIOS PARA DIAGNÓSTICO DE DIABETES				
	NORMAL	PRÉ-DIABETES	DIABETES	
Glicemia em Jejum	<99 mg/dL	100-125 mg/dL	≥126 mg/dL	
Glicemia 2h após 75g de Glicose	<139 mg/dL	140-199 mg/dL	≥200 mg/dL	
HbA _{1c}	-	5,7-6,4%	>6,5%	
Glicemia Casual	-	-	≥200 mg/dL*	

Sociedade Brasileira de Diabetes – Posicionamento Oficial Julho 2011 *com sintomas de diabetes

Figura 1. Representação dos valores glicêmicos e os critérios de diagnóstico de diabetes. (adaptado da sociedade Brasileira de diabetes, 2011)

1.2 PATOLOGIA E PATOGÊNESE

Independente da origem, todos os tipos de DM resultam de uma deficiência relativa de ação da insulina. Além disso, em ambos os tipos, 1 e 2, os níveis de glucagon parecem ser inapropriadamente altos. Essa alta razão glucagon/insulina cria um estado semelhante ao visto no jejum, e resulta em um cenário de “superjejum”, que é inadequado para a manutenção da homeostase dos nutrientes, neste sentido os desarranjos metabólicos são proporcionais ao grau de deficiência na ação da insulina^{10,11}.

O tecido adiposo é muito sensível à carência da insulina, e sua baixa concentração afeta a via de sinalização que é capaz de suprimir a lipólise, reduzindo o armazenamento de gordura, sendo necessários níveis mais altos de insulina para se opor aos efeitos do glucagon sobre o fígado e bloquear a saída de glicose hepática. Em indivíduos normais, os níveis basais de atividade da insulina são capazes de mediar essas respostas. Contudo, a capacidade do músculo e de outros tecidos sensíveis à insulina de responder a uma carga de glicose, com captação de glicose mediada por insulina, requer que a secreção da mesma pelo pâncreas seja estimulada mesmo em indivíduos normais¹¹⁻¹³.

Portanto, as deficiências leves na ação da insulina são manifestadas, primeiramente, por uma incapacidade dos tecidos sensíveis à insulina de captar cargas de glicose. Clinicamente, isso resulta em uma hiperglicemia pós-prandial. Tais indivíduos, mais comumente diabéticos tipo 2, que tem secreção residual de insulina, associada à resistência à mesma, terão testes de tolerância à glicose oral anormais. Entretanto, os níveis de glicemia em jejum permanecem normais, por ainda existir uma ação da insulina suficiente para contrabalancear a saída hepática de glicose mediada pelo glucagon. Quando ocorre uma perda maior de ação da insulina, os efeitos do glucagon sobre o fígado não serão contrabalanceados suficientemente. Logo, os indivíduos tanto têm a hiperglicemia pós-prandial como a hiperglicemia em jejum¹²⁻¹⁴.

Embora os diabéticos tipo 2, em geral, tenham algum grau residual de ação da insulina endógena, os diabéticos tipo 1 não têm e, portanto, se não tratados, ou inadequadamente tratados, manifestam os sinais mais graves de deficiência de insulina. Clinicamente esses indivíduos podem apresentar a cetoacidose juntamente com a hiperglicemia em jejum e a pós-prandial¹⁴⁻¹⁶.

Os ácidos graxos provenientes do tecido adiposo a partir do aumento da lipólise, além de serem metabolizados pelo fígado em corpos cetônicos, também podem ser reesterificados e embalados em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Além do mais, a deficiência de insulina causa uma diminuição da lipase lipoprotéica, a enzima responsável pela hidrólise dos triglicerídios VLDL, em preparação para o armazenamento de ácidos graxos no tecido adiposo, tornando lenta a depuração de VLDL. Em consequência, tanto os diabéticos tipo 1 como tipo 2 podem ter elevações dos níveis de VLDL, como resultado de um aumento da produção de VLDL e de uma diminuição de sua depuração^{17,18}.

Como a insulina estimula a captação de aminoácidos e a síntese de proteínas nos músculos, a diminuição da ação da insulina, no DM, resulta em redução da síntese protéica no tecido muscular. Uma escassez acentuada de insulina, como ocorre em diabéticos tipo 1, prejudica a captação de aminoácidos pelos músculos, os quais são utilizados pelo fígado como substrato para a gliconeogênese^{17,18}.

Em diabéticos tipo 1 ou tipo 2, a superposição de hormônios contra-reguladores, induzida pelo estresse, ao que já é um estado de carência de insulina, exacerba as manifestações metabólicas da deficiência de ação da insulina a outros tecidos-alvo^{15,16,18}.

O aumento crônico da glicemia resulta em desenvolvimento de neuropatias periféricas, disfunções gastrointestinais e renais, imunodeficiências, lesões microvasculares e desordem na reparação de tecidos (pele, intestino e outros), além do acometimento articular, que ainda é pouco estudado. Todos os aspectos citados podem resultar em aumento da morbidade ou mortalidade relacionada primariamente com complicações macrovasculares ou microvasculares^{19,20}.

Figura 2- Diagrama demonstrando a fisiopatologia da doença cardiovascular no diabético. (Adaptado de Creager et al.¹¹)

1.2.1 Complicações Microvasculares

O acometimento das estruturas articulares, em destaque o tecido sinovial, está diretamente relacionado ao desbalanço nutricional, ocorrido por lesões e alterações microvasculares, o qual ainda não foi descrito na literatura. Acredita-se que quatro vias principais contribuam para o dano microvascular induzido pela hiperglicemia na diabetes : (1) aumento do fluxo na via do poliol, (2) ativação da proteinocinase C (PKC), (3) fluxo aumentado na via das hexosaminas, e (4) aumento da formação de proteínas irreversivelmente glicadas, chamadas de produtos finais da glicação avançada (AGE)¹⁹⁻²².

Dentre essas, o aumento da formação de AGE tem papel importante principalmente no entendimento dos mecanismos envolvendo a matriz extracelular e seus componentes.

Acredita-se que a AGE cause lesão microvascular no DM, pois quando presente em altas concentrações, a glicose pode reagir de forma não enzimática com grupos amina em proteínas para formar um intermediário instável, uma base de Schiff, a qual sofre, então, um rearranjo interno, para formar uma proteína glicosilada estável, também conhecida como um produto da glicação precoce (produto de Amadori). Os produtos da glicação precoce podem sofrer uma série de reações químicas e rearranjos, levando à formação de AGE, que são conectados de forma covalente e irreversível por ligações

cruzadas derivadas da glicose, e baseadas em imidazol e pirrol. Um AGE pode prender-se a componentes da matriz da membrana basal promovendo uma modificação na formação de proteínas, como o colágeno²⁰⁻²³.

Nos diabéticos, tanto pequenos como grandes vasos mostram um acúmulo contínuo de proteínas AGE. Há hipóteses de que isso possa ser devido ao acúmulo direto de AGE, ou à captura de outras proteínas plasmáticas normais, como lipoproteínas de baixa densidade (LDL), pelas AGE acumuladas. Além disso, a ligação de AGE a receptores específicos nos macrófagos causa a liberação de citocinas, que podem, por sua vez, afetar a proliferação e a função das células vasculares (**Figura 2 e 3**)²²⁻²⁷.

Figura 3. Efeitos dos AGEs. Ciclo da divisão celular da proteína 42 (Cdc42). Síntese endotelial do óxido nítrico (eNOS). Molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1). Proteína ativada por mitógeno (MAP); Dinucleótido fosfato de nicotinamida, (NAD(P)H). Óxido nítrico (NO). Espécies reativas de oxigênio (ROS). Fonte: Adaptado de: Goh S , and Cooper M E JCEM 2008;93:1143-1152

Todos esses fatores ocasionados pela hiperglicemia e que acometem tanto os grandes como pequenos vasos, desenvolvem nos pacientes alterações funcionais de tecidos alvos dependentes de irrigação como a capsula articular.³³

1.3 COMPROMETIMENTO ARTICULAR NO DM

Sabe-se que, a DM está associada a vários distúrbios osteoarticulares, divididos em duas grandes categorias: 1-Transtornos que representam complicações intrínsecas do diabetes, tais como: a) limitação da mobilidade articular, b) quiroartropatia diabética ou síndrome da mão rígida; c) Dupuytren, capsulite do ombro e tenossinovite dos flexores; 2- Doenças para as quais existe uma possível associação com o diabetes, como osteoartrite e síndrome do túnel do carpo de etiologia ainda desconhecida²⁸⁻³². A alteração dos tecidos das articulações de diabéticos pode resultar em tendinites e artroses, que provocam dores, desconforto e rigidez, e pode comprometer a locomoção. Porém isso são consequências que devem ser estudadas na literatura com maior aprofundamento³³.

Na literatura há uma escassez de trabalhos que correlacionam os efeitos da hiperglicemia ao comprometimento articular, porém, em estudo recente do nosso grupo foi desenvolvido em modelo experimental em ratos, onde foi observado que os componentes articulares como ligamentos, cartilagem e a própria sinóvia são altamente afetadas, e demonstram remodelamento anormal. Como resultado, observamos que os tecidos como tendão, cartilagem e osso estavam em processo de remodelamento inicial, enquanto a sinóvia apresentavam uma fibrose estabelecida. Este processo pode promover a degradação da matriz extracelular, comprometendo, assim, a função articular como um todo. Porém não se sabe ao certo qual mecanismo articular desempenha papel de destaque na perpetuação desta alteração, porém devido a sua alta vascularização e sua função na nutrição articular o tecido sinovial parece ser fundamental nesta questão. Dessa forma, importantes questionamentos foram desenvolvidos e investigados como quais tipos de colágenos estão sofrendo remodelamento intenso, em que período da doença isso começa a ocorrer, e quais os principais moduladores³³.

1.4 SINÓVIA

Dentre os componentes articulares a sinóvia é uma importante estrutura afetada no DM. A sinóvia consiste de um espaço tecidual modificado, formada pelas células de revestimento da membrana sinovial. A membrana sinovial é um fino revestimento (~50nm em humanos), composto por macrófagos, “fibroblastos-like”, adipócitos, mastócitos, fibras nervosas, células endoteliais vasculares, ocasionalmente linfócitos e capilares fenestrados, que repousam em uma matriz especializada conhecida como íntima e subíntima. A íntima contém dois ou possivelmente três tipos de células. As células do tipo A originárias da medula óssea as quais expressam os marcadores de macrófagos incluindo CD68 e CD14 e as células do tipo B, envolvidas na síntese do colágeno.³⁴⁻³⁷

Esta camada está ainda associada a uma matriz fibrilar fina ou amorfa com fibras colagênicas ausentes ou intermitentes, apoiada sobre uma tela mais espessa (~100 nm) de tecido conjuntivo frouxo chamado subsinovial que inclui um sistema extensivo dos vasos linfáticos para o apuramento das moléculas transportadas. Ao lado destas fibras, existe um tecido conjuntivo frouxo relativamente rico em colágeno, bastante distensível, junto aos ligamentos, tendões, periósteo ou outras estruturas fibrosas que permite à membrana movimentar-se livremente.²⁷⁻²⁹ (figura 4)

Figura 4. Representação do tecido sinovial e seus componentes na estrutura articular do joelho (Adaptada da Wikipédia, enciclopédia livre)

O líquido sinovial das articulações, normalmente funciona como um lubrificante biológico, bem como um suporte bioquímico através do qual nutrientes e citocinas reguladoras podem atravessar e chegar na superfície articular (Figura 4). As células da membrana sinovial formam uma camada descontínua, separada por espaços intercelulares de diversos micrômetros de largura. A matriz extracelular desse tecido é composta principalmente por colágeno tipo I e menor proporção dos tipos III, IV, V e VI, sulfato de condroitina, proteoglicanos e fibronectina.^{35,36,40,41}

O acometimento sinovial pode prejudicar a nutrição da articulação favorecendo diversas alterações na mobilidade e reestruturação da cápsula articular. Diversos processos podem ser responsáveis por sua modificação como os AGES, que se ligam as fibras de colágeno modificando sua estrutura e consequentemente sua função, uma vez que o grau de glicação enzimática está diretamente relacionado com o nível de glicemia, resultando em aumento da rigidez vascular e seu envelhecimento precoce. Este processo pode influenciar na nutrição realizada por este vaso e afetar estruturas dependentes. Os componentes deste remodelamento, aparentemente, estão relacionados à síntese aumentada das citocinas e dos colágenos^{37,39,40-42}.

1.5 COLÁGENO

O colágeno é uma glicoproteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular, presente em quase todos os tecidos assim como na pele, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas. As características biomecânicas dos tecidos resultam da organização dos colágenos em macromoléculas, que fornecem não apenas suporte, mas apresentam importante papel funcional, determinado pelos seus domínios proteicos adicionais. Sabe-se que além da função de suporte, participa na diferenciação, adesão, migração e proliferação celular. Além das funções citadas, esta proteína pode exercer atividade antigênica variando com seu tipo e órgão envolvido^{44,45}.

As moléculas de colágeno fibrilar são formadas através do entrelaçamento de três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias α , arranjadas numa conformação de tripla

No processo de biossíntese do colágeno são envolvidas diversas etapas bioquímicas determinando um processo complexo, que se inicia no núcleo com a transcrição gênica, estimulada por fatores de crescimento, incluindo o $TGF\beta^{47}$. Após a tradução, as moléculas de pró-colágeno sofrem várias modificações no retículo endoplasmático rugoso, tais como hidroxilação dos resíduos de prolina e de lisina, e posterior glicação dos resíduos de hidroxilisina, sendo esta, fundamental para a formação das pontes cruzadas intramoleculares de hidrogênio,^{44,46} como pode verificar na **Figura 6**.

Figura 6 - Pontes intra e intermoleculares dos colágenos fibrilares. Estas pontes resultam da hidroxilação da prolina e da lisina, respectivamente, e são importantes para a manutenção das propriedades físicas e da estabilidade da molécula de colágeno. Fonte: Adaptado de Alberts *et al.*, 2010.⁴⁴

Ainda no retículo endoplasmático rugoso, as três cadeias alfas entrelaçam-se por meio de seus pró-peptídeos carboxiterminais, contendo o grupos amino (NH_2) e carboxi ($COOH$), estas moléculas em forma de tripla hélice são empacotadas no complexo de Golgi e secretadas.^{46,47} Este processo completo pode ser visualizado na **Figura 7**.

Figura 7. Diagrama esquemático mostrando a biossíntese dos colágenos fibrilares. 1 A cadeia pró-alfa é sintetizada no lúmen do retículo endoplasmático. 2 Posteriormente, esta cadeia sofre hidroxilação de alguns resíduos de prolina e de lisina. Em seguida, a hidroxilisininas sofrem glicação ou glicolisação e as três cadeias pró-alfa entrelaçam-se formando a tripla hélice de pró-colágeno, que é empacotado no complexo de Golgi e secretado. 3 Já no espaço extracelular, os pró-peptídeos amino e carboxi-terminal dos colágenos I e III são clivados e as moléculas recém-formadas de colágeno agregam-se, 4 formando as fibrilas que, por sua vez, unem-se formando as fibras colágenas.

Após secreção na matriz extracelular esses grupos amino e carboxi são removidos dessas cadeias alfas pelas NH₂ e COOH-proteinase, permanecendo apenas em colágenos diferenciados como o COLV. Este processo resulta em uma molécula nativa de tripla hélice com dimensões aproximadas de 300nm de comprimento e 1,5nm de diâmetro, a qual retém telepeptídeos curtos, com poucos aminoácidos^{46,47}. (**Figura 8**)

No processo de fibrilogênese as moléculas de colágeno agregam-se segundo uma orientação cabeça-cauda, formando as fibrilas de colágeno.^{44-,47}

Figura 8- Representação esquemática do arranjo de moléculas de tropocolágeno em estruturas fibrilares e de fibrilas.

Um fato importante na DM é que na vigência de hiperglicemia, mudanças na estrutura do colágeno ocorrem por meio de glicação, que se caracteriza pela ligação covalente não enzimática entre a glicose ou outros açúcares redutores e a porção NH₂-terminal da cadeia polipeptídica e dos resíduos de lisina e arginina. Conforme já citado anteriormente, a reação inicial é lenta formando um composto instável chamado Base de Schiff. A progressão da reação induz a formação dos produtos de glicação ou produtos de Amadori os quais, por meio de rearranjos intra e intermoleculares geram os AGE (**Figura 9**).^{48,49} Os AGE alteram, irreversivelmente, a estrutura primária das proteínas e, conseqüentemente sua função biológica, devido a sua meia vida ser de longa duração. O colágeno é bastante suscetível ao processo de glicação, contribuindo como um importante determinante para as complicações ao longo prazo do DM.^{49,50}

A carboximetilisina, o AGE mais estudado no DM, encontra-se invariavelmente em área de lesão onde, por meio de interação com receptores para AGE (RAGE), induz a expressão de mediadores inflamatórios e apoptose celular.⁵⁰

Figura 9. Glicação não enzimática de proteínas em seres humanos, com suas três fases: Iniciação, propagação e AGE (Produto e glicação avançada). As moléculas com forma de cadeira em cinza escuro, representam proteínas de vida longa, e em seu interior “lis” representa um aminoácido em particular lisina, cujos resíduos amino ($-NH_3^+$) são particularmente susceptíveis a glicação (Adaptada de OMOS 2009)

1.6 INTERAÇÃO RAGE E AGE

O receptor para produtos de glicação avançada (RAGE) é um multiligante, membro da superfamília das imunoglobulinas de moléculas de superfície celular, e normalmente é expresso em níveis baixos em condições fisiológicas normais na maioria dos tecidos.^{51,52}

Apesar de ser mais conhecido pela ligação aos AGEs, ele também interage com ligantes estruturalmente distintos, mas com conformações semelhantes, permitindo

reconhecimento de uma variedade de sequências primárias de resíduos de aminoácidos⁵³.

Através da interação com ligantes, o RAGE ativa vias pró-inflamatórias, pró-coagulantes ou pró-fibróticas, além de gerar estresse oxidativo, promove uma série de respostas celulares envolvidas principalmente nos processos inflamatórios e complicações associadas ao diabetes e a doença cardiovascular

Figura 10. Representação esquemática da estrutura do receptor RAGE. Fonte: adaptado de Schmidt e Stern (2000)⁵³. Segundo Schmidt e Stern (2000) o receptor RAGE é uma proteína de aproximadamente 45 kDa, membro da superfamília das imunoglobulinas de superfície celular. A região extracelular de RAGE consiste de três domínios de imunoglobulina: um N-terminal do tipo V (variável), seguido por dois do tipo C (constante) estabilizados por pontes de enxofre internas entre resíduos de cisteína. Uma única região transmembrana fixa o receptor RAGE na membrana e uma pequena cauda citosólica de 43 resíduos de aminoácidos altamente carregada, interage com as moléculas de transdução de sinal citosólicas.

Os AGEs constituem um grupo heterogêneo de compostos responsáveis por efeitos adversos, incluindo redução de atividade enzimática, danos a ácidos nucleicos, indução de vias citotóxicas, e formação de ligações cruzadas (cross-linking) entre proteínas através do RAGE^{53,54}.

Acredita-se que os AGEs atuem modificando: proteínas intracelulares envolvidas na regulação gênica; moléculas da matriz extracelular vizinha, interferindo na sinalização entre a matriz e a célula, causando disfunção celular e proteica,

interferindo diretamente na homeostase dos componentes intrínsecos da matriz. Os AGEs se acumulam na maioria dos órgãos-alvo que podem ser acometidos no diabetes, como rim e retina e, ainda, nas placas ateroscleróticas. O rim é o principal alvo dos danos mediados por AGEs, tendo em vista que representa o maior sítio de *clearance* destes produtos^{52,53}.

O N (carboximetil) lisina (CML) e outros AGEs têm sido encontrados em vasos retinianos de portadores de diabetes e se correlacionam com o grau de retinopatia. Elevados níveis de AGEs têm também sido documentados em nervos periféricos de portadores de diabetes e em modelos animais, demonstrou-se que AGEs pioram a neuropatia diabética por reduzirem a velocidade de condução nervosa e o fluxo sanguíneo para os nervos periféricos^{48,50,54}.

1.7 ENDOTELINA

Nas doenças metabólicas, o endotélio tem importante papel na regulação do ambiente vascular e perivascular, mantendo uma superfície não trombótica e regulando a permeabilidade e o tônus vasomotor. Situadas na interface entre sangue e tecido, as células endoteliais estão constantemente expostas a vários agentes e em resposta adquirem propriedades pró-inflamatórias e pró-coagulantes. O endotélio produz peptídeos denominados endotelinas, que são mensageiros químicos dentro do organismo reconhecidos como os vasoconstritores mais potentes e de efeitos mais duradouros^{55,56}.

Há quatro tipos de endotelinas: ET-1, 2, 3 e 4. A Endotelina 1 (ET-1) é o único membro da família produzida tanto nas células endoteliais, como nas células musculares lisas dos vasos. A ET-1 causa vasoconstrição de quase todas as artérias e veias, além de produzir proliferação das células musculares lisas dos vasos e modular a produção hormonal(36). Esse peptídeo é essencial para controlar a atividade do vaso sanguíneo e, sob condições normais, seus níveis são baixos. Contudo, em estados patológicos tais como o diabetes, na hipertensão arterial pulmonar (HAP), nas doenças do tecido conjuntivo como a esclerodermia e fibrose do pulmão seus níveis elevam-se de forma significativa. Níveis elevados de ET-1 podem causar vários efeitos deletérios por meio da ligação com seus receptores. Estudos em modelos experimentais de diabetes

mostraram que aumentos dos níveis de ET-1 estão relacionados com a etiologia das disfunções neurovasculares que ocorrem nessa doença.^{55,56}

1.8 TGF-B

As moléculas de adesão são proteínas envolvidas na interação célula-célula e célula-matriz extracelular⁶⁰ sendo expressas por células endoteliais ativadas.^{61,62} Estas moléculas permitem a interação entre leucócitos e fibroblastos e o aporte de linfócitos para os tecidos⁶¹. Com o início da cascata de ativações das células endoteliais fatores de crescimento são estimulados. Dentre os fatores de crescimento produzidos pelas células endoteliais ativadas, destaca-se o fator de crescimento beta (TGF- β)^{62,63}, citocina-chave na patogênese de várias doenças com a esclerose sistêmica.⁶⁴

Visto que na literatura foi descrito um processo de remodelamento das estruturas articulares no diabetes, é possível que este fator esteja ativado no tecido sinovial, assim como no modelo animal de fibrose pulmonar induzido por bleomicina. Neste modelo, já no sétimo dia após a instilação da droga, ocorre maior expressão de TGF β e CTGF nas células endoteliais, resultando no aumento da síntese de COLI. Apenas no 14º dia após a instilação estes fatores de crescimento passam a ser produzidos pelos fibroblastos, comprovando a importância das células endoteliais na iniciação do processo fibrótico⁶³.

1.9. MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES

A estreptozotocina é um antibiótico derivado N-nitroso da D-glucosamina que foi inicialmente isolado no ano de 1960 a partir de cultura de *Streptomyces achrou*. O efeito diabetogênico dessa droga ocorre devido à lesão seletiva das células beta pancreáticas, que normalmente regulam os níveis de glicose no sangue, produzindo o hormônio insulina. Isto sugeriu o uso da droga como um modelo animal de diabetes e como um tratamento médico para câncer das células beta. Atualmente essa droga tem ampla utilização na indução de diabetes experimental.⁶³⁻⁶⁶

Em síntese, o comprometimento articular no DM, até o presente momento, foi pouco estudado. No entanto, resultados descritos por nosso grupo³³ demonstraram que o tecido sinovial sofre intenso remodelamento após dois meses de indução do DM em ratos. Estes dados mostraram-se relevantes quando comparados às alterações encontradas nas estruturas articulares adjacentes. Outro fato importante foi o aumento das fibras de colágeno do tipo I na sinóvia, no período estudado, pois enquanto a cartilagem, ligamentos e tendões apresentavam um remodelamento caracterizado pela síntese de fibras finas de colágeno dos tipos III e V, o tecido sinovial apresentava-se totalmente remodelado por fibras de colágeno do tipo I.³³

Nesta linha de pensamento, nossa proposta no presente estudo foi identificar, através de uma avaliação temporal, o início do processo de remodelamento sinovial no modelo de DM com estreptozotocina e seus possíveis mediadores. Este estudo será de grande relevância para o entendimento da fisiopatogênese do comprometimento articular presente no paciente diabético.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal do estudo foi realizar análise temporal dos colágenos (I, III e V) e produtos de glicação avançada no tecido sinovial em modelo experimental de diabetes em ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.1.** Avaliar e quantificar o perfil histomorfológico do tecido sinovial e dos colágenos (I, III e V) na sinóvia de ratos diabéticos e controle nos tempos de indução;
- 1.2.** Quantificar e avaliar a distribuição do RAGE, AGE e citocinas no tecido sinovial e sua correlação com o tempo de doença e o remodelamento sinovial.
- 1.3.** Quantificar a expressão gênica de COLI, III e V na sinóvia de ratos diabéticos comparando-se com controles.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DESENVOLVIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL

3.1.1. Animais

O trabalho foi desenvolvido após a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa, CEP-FMUSP-149/13, da Diretoria Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados ratos Wistar (n=60) com 2,5 meses de idade (peso corporal de 200-250g), os quais foram obtidos a partir do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Durante o período de realização dos experimentos, os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Clínica Médica, com ciclo de 12 h claro/12 h escuro, à temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, recebendo água e ração padronizada *ad libitum*.

3.1.2. Indução de diabetes

Com o objetivo de assegurar homogeneidade entre os grupos de ratos, amostras de sangue foram coletadas a partir da veia caudal dos animais, mantidos por 12 horas em jejum, para determinação da glicemia utilizando a glicosina (An Accu Chek® Product Advantage – Produtos Roche Químicos Farmacêuticos S/A), antes do início do experimento.

A indução de diabetes foi realizada mediante a infusão intravenosa aguda de estreptozotocina (35 mg/kg de peso corporal – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) na cauda dos animais (n=30), sob anestesia intraperitoneal de pentobarbital sódico (Hypnol® 60 mg/kg de peso corporal).^{66,65} A estreptozotocina foi diluída em solução de cloreto de sódio 0,9% (Solução fisiológica - Baxter Hospitalar Ltda, SP, Brasil) com pH 7,2 – 7,4 e imediatamente infundida nos animais. Como controle, um grupo de animais (n=30) foi submetido à infusão do mesmo volume de solução fisiológica, nas mesmas condições.

Após uma semana da infusão, amostras de sangue foram coletadas da veia caudal, dos animais mantidos 5,5 horas em jejum, para a determinação da glicemia (An

Accu Chek® Product Advantage – Produtos Roche Químicos Farmacêuticos S/A).

Os ratos com indução experimental de diabetes (grupo diabético - GD) foram divididos em três grupos, de acordo com o tempo de indução da doença até a eutanásia: GD1 (n=10), 7 dias de diabetes; GD2 (n=10), 30 dias de diabetes e GD3 (n=10), 60 dias de diabetes. O grupo controle (GC) foi dividido em três grupos, pareados com os grupos diabéticos: GC1 (n=10), mantido por 7 dias; GC2 (n=10), mantido por 30 dias e GC3 (n=10) mantidos 60 dias. Ao final de cada período, os animais foram novamente mantidos por 5,5 horas em jejum, para coleta de sangue e avaliação da glicemia. Após eutanásia dos animais com CO₂, de acordo com os princípios da experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), o tecido sinovial foi coletado e separado de maneira homogênea para análise histológica, bioquímica e molecular.

Outros tecidos foram também coletados para trabalhos futuros. As carcaças foram embaladas em sacos plásticos para materiais biológicos, identificados, e mantidos em freezer -20°C até serem descartadas, conforme as normas de biossegurança estabelecidas pela FMUSP.

3.2. MICROSCOPIA ÓPTICA

O tecido sinovial coletado para análise histológica foi fixado em formol 10%, durante aproximadamente 24 horas. Após este período, as amostras do tecido foram envolvidas por papel seda, para garantir melhor disposição espacial, e submetidas às técnicas histológicas de rotina para embeber em parafina. Foram realizados 10 cortes com 4-5µm de espessura e um espaço de 50µm entre eles. Posteriormente, foram corados pela hematoxilina eosina (H&E), para avaliar a estrutura do tecido e possíveis células inflamatórias em microscópio óptico. Para avaliação do conteúdo de colágeno tecidual em microscópio óptico e luz polarizada, as amostras foram coradas pelo Picrosirius, preparado a partir de *Sirius red* 0,2% em solução saturada de ácido pícrico (Direct Red 80, C. I. 35780, Aldrich, Milwaukee, WI).

3.3. AVALIAÇÃO DO COLÁGENO NO TECIDO SINOVIAL

3.3.1. Avaliação do colágeno total nos compartimentos sinoviais por morfometria

As lâminas coradas pelo Picrosirius foram utilizadas para análise quantitativa do colágeno total presente nos compartimentos sinoviais (membrana sinovial, tecido sub-sinovial e vaso). Para isso, foi utilizado o método estereológico de contagem de pontos, por meio de um retículo formado por 100 pontos e 50 linhas, cada uma medindo 25 μ m de comprimento, adaptado a microscópio convencional (**Figura 8**). Foram somados os pontos que incidiam sobre a marcação das fibras e os campos não marcados, avaliando-se 5 campos randomizados, em aumento de 100x. Posteriormente, foi calculada a porcentagem de marcação em cada compartimento e o resultado final das médias foi submetido à análise estatística.⁶⁷

Figura 11. Imagem representativa do método estereológico de contagem de pontos por meio de um retículo adaptado a microscópio convencional.

3.3.2. Avaliação do colágeno total por análise de imagem

As lâminas coradas pelo Picrosírius foram analisadas em microscópio óptico, equipado com um polarizador de luz, e quantificadas por um sistema de análise de imagem. O sistema utilizado consiste de uma câmera CCD Sony, acoplada a um microscópio Olympus, a partir do qual as imagens são visualizadas no monitor. Através de um sistema digital inserido num computador (Pentium 4), as imagens foram processadas por um *software Image-Pro Plus 6.0*. As amostras foram analisadas às cegas, sendo selecionados aleatoriamente 5 campos, num aumento de 400x, para as seguintes regiões: sinovial e subsinovial (**Figura 9**). A área total do tecido analisado em cada campo foi medida pelo *software Image-Pro Plus 6.0*. O colágeno presente nos campos adquiridos foi avaliado através da seleção de tonalidades birrefringentes vermelho-alaranjadas ou verde-amarelada, correspondente às fibras colágenas polarizadas grossas e finas, respectivamente. A área das fibras colágenas (grossas e finas) foi dividida pela área total de tecido analisado e o resultado final expresso em porcentagem.⁶⁸

Figura 12. Imagem representativa da análise de imagens pelo *software Image-Pro Plus 6.0*, mostrando a área total a ser analisada delimitada (verde), e a marcação das fibras finas (azul; setas).

3.3.3. Quantificação de Colágeno pela Dosagem da 4-hidroxirolina

A dosagem da 4-hidroxirolina foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Bergmann e Loxley (1963), que envolve quatro processos: hidrólise ácida, neutralização, oxidação e coloração. As amostras de tecido sinovial dos animais dos grupos diabéticos e controles foram pesadas antes e após a liofilização. Os tecidos liofilizados foram solubilizados em 3 ml de HCl 6N em tubos pirex, resistentes à alta temperatura, e mantidos durante 22 horas a 100°C, para a hidrólise ácida. As amostras hidrolisadas foram filtradas e 1ml do filtrado foi neutralizado (pH entre 6,5 e 7,0), com solução 100% saturada de hidróxido de lítio. Posteriormente, a 1 ml de amostra com pH neutro foram adicionados 2ml de isopropanol e 1ml de solução oxidante, contendo cloramina T 7%. Esta mistura foi mantida por 4 minutos, em temperatura ambiente, para que ocorresse a reação de oxidação. Logo após, para o desenvolvimento da reação colorimétrica, foram adicionados 2 ml do reagente de Ehrlich (ácido perclórico, álcool isopropílico e 4-dimetilaminobenzaldeído) à amostra oxidada, mantendo-se os recipientes vedados em banho Maria, a 60°C, por 20 minutos. Foram preparadas 2 soluções-padrão para o controle de cada ensaio: 1. Solução padrão de 4-hidroxirolina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) na concentração de 4 µg/ml, dissolvida em 1 ml de água destilada; 2. Controle Branco: 1 ml de água destilada. A estas soluções foram acrescentados os mesmos reagentes utilizados nas amostras, nas mesmas proporções e condições. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 560nm. Como controle de qualidade da reação foi utilizado um fator (F) de variância entre 9 e 13, calculado pela divisão do número 4 pela absorbância do padrão de 4-hidroxirolina. O cálculo da concentração de 4-hidroxirolina foi feito pela relação abaixo e o resultado foi dado em µg de 4-hidroxirolina por mg de tecido sinovial.

$$\frac{F \times \text{Absorbância da amostra} \times \text{Volume do neutralizado} \times 3\text{ml (volume de HCl)}}{\text{Peso seco / úmido da amostra}}$$

3.3.4. Imunofluorescência para colágeno dos tipos I, III e V no tecido sinovial

Para a imunofluorescência dos colágenos, os cortes de 4µm de espessura do tecido sinovial de ratos diabéticos e controles, foram aderidos em lâminas, previamente tratadas com *3-aminopropiltriethoxy Silano* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A reação foi iniciada pela desparafinização dos cortes através da imersão das lâminas em xilol aquecido, a 60°C, por 30 minutos, e dois banhos de 10 minutos em xilol em temperatura ambiente. A reidratação dos cortes foi realizada por sucessivas lavagens em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-75%), seguido de lavagem em água corrente, por 10 minutos, um banho em água destilada e 10 minutos em tampão fosfato de sódio, pH7,4 (PBS). Para a exposição e recuperação de sítios antigênicos, os cortes foram submetidos à digestão com pepsina bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; 10000 UTI/ml) na concentração de 4mg/ml em ácido acético 0,5N, por 30 minutos, a 37°C. Ao término desta incubação os cortes foram submetidos a um ciclo de lavagens com PBS, por três vezes de 10 minutos, e os sítios inespecíficos bloqueados com leite desnatado a 5% em PBS, durante 30 minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas durante uma noite com os anticorpos de coelho policlonais anticolágeno dos tipos I (Rockland) (1:50), III (1:50) e V (1:50), diluídos em solução de PBS (Tabela 1). Após este período, os cortes foram lavados em PBS, com Tween₂₀ 0,05% e incubados por 90 minutos com os anticorpo de cabra anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo, conjugados ALEXA 488 (Invitrogen, Life Technologies) diluídos 1:200 em solução de PBS, contendo azul de Evans 0,006% (Tabela 1). Por fim, as lâminas foram novamente lavadas, por cinco vezes com PBS com Tween₂₀ 0,05%, montadas com solução de glicerina tamponada e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan).

Tabela1. Anticorpos utilizados em imunofluorescência.

Marcador	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
COLI	Anti-COLI, policlonal de coelho (Rockland)	Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho. (ALEXA 488, Invitrogen, Life Technologies)
COLIII	Anti-COLIII, policlonal de coelho (Laboratório de Matriz Extracelular, FMUSP)	Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho. (ALEXA 488, Invitrogen, Life Technologies)
COLV	Anti-COLV, policlonal de coelho. (Laboratório de Matriz Extracelular, FMUSP)	Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho. (ALEXA 488, Invitrogen, Life Technologies)

3.3.5. Histomorfometria do colágeno dos tipos I, III, IV e V no tecido sinovial

A análise histomorfométrica foi realizada para quantificar a densidade de fibras imunomarcadas de colágeno dos tipos I, III e V, por meio de análise de imagem. Resumidamente, este sistema é constituído por uma câmara fotográfica (Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canada) acoplada a um microscópio (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan), que captura as imagens e as envia para o monitor, por um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canada). As imagens são então processadas por um *software* (*Image-Pro Plus 6.0*) que permite quantificar as fibras imunomarcadas em verde fluorescente.

A densidade das fibras de colágeno foi medida em todos os campos microscópicos, por observador, às cegas, sendo adquiridas aleatoriamente 10 imagens de cada caso, em aumento de 400x (**Figura 10**). A área de cada campo analisado foi medida em μm^2 e utilizando-se os recursos do *software Image-Pro Plus 6.0*, de seleção de cores, a tonalidade verde fluorescente foi quantificada. A média da área do conteúdo de colágeno foi dividida pela média da área total analisada e o resultado final expresso em porcentagem⁶⁹.

Figura 13. Imagem representativa da análise de imagens pelo *software Image-Pro Plus 6.0*, mostrando a delimitação da área do tecido sinovial avaliada (verde) e a marcação do colágeno (vermelho, seta).

3.4. AVALIAÇÃO DE RAGE E CML

3.4.1. Imunofluorescência para RAGE e CML

Cortes de 4µm de espessura do tecido sinovial de ratos diabéticos e controles foram aderidos em lâminas, previamente tratadas com *3-aminopropiltriethoxy Silano* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A reação foi iniciada pela desparafinização dos cortes, através da imersão das lâminas em xilol aquecido, à 60°C por 30 minutos, e dois banhos de 10 minutos em xilol à temperatura ambiente. A reidratação dos cortes foi realizada por sucessivas lavagens em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-75%), seguido de lavagem em água corrente, por 10 minutos, um banho em água destilada e 15 minutos em PBS. Para a exposição e recuperação de sítios antigênicos, os cortes foram submetidos à digestão com proteinase k, por 30 minutos, a 37°C. Ao término desta incubação os cortes foram submetidos a um

ciclo de lavagens com PBS, por três vezes de 10 minutos. Para bloqueio da autofluorescência das hemácias presentes nos cortes, foi realizada incubação de 10 minutos com água oxigenada 3%. Ainda, os cortes foram incubados consecutivamente com avidina/biotina (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA), por 10 minutos, e leite desnatado 5% em PBS, durante 30 minutos, para bloqueio de sítios inespecíficos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com anticorpos os monoclonais anti-RAGE (1:100) e anti-CML (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), diluídos 1:100 em PBS, por uma noite à 4°C (**Tabela 2**). Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS, com Tween₂₀ 0,05% e incubados por 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpo conjugado de burro anti-IgG de cabra ALEXA 488 (Invitrogen, Life technologies), diluído 1:200 em solução de PBS, contendo azul de Evans 0,006% (**Tabela 2**). Por fim, as lâminas foram novamente lavadas, por cinco vezes com PBS com Tween₂₀ 0,05%, montadas com solução de glicerina tamponada e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan).

Tabela2. Anticorpos utilizados em imunomarcação.

Marcador	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
RAGE	Anti-RAGE monoclonal (Calbiochem, Alemanha)	IgG donkey anti IgG goat Alexa 488 (Invitrogen, Life technologies)
CML	Anti-CML monoclonal (Calbiochem, Alemanha)	IgG donkey anti IgG goat Alexa 488 (Invitrogen, Life technologies)

3.4.2. Histomorformetria para RAGE no tecido sinovial

A análise histomorfométrica foi realizada para quantificar a imunomarcação de RAGE em verde fluorescente, por meio de análise de imagem, utilizando o *software Image-Pro Plus 6.0* (**Figura 11**). A densidade da marcação foi medida em todos os campos microscópicos, por observador, às cegas, sendo adquiridas aleatoriamente 10 imagens de cada caso, num aumento de 400 vezes. A área de cada campo analisado foi medida em μm^2 e utilizando-se os recursos do *software Image-Pro Plus 6.0*, de seleção de cores, a tonalidade verde fluorescente foi quantificada. A média da área do conteúdo

de RAGE marcado foi dividida pela média da área total analisada e o resultado final expresso em porcentagem.

Figura 14. Imagem representativa da análise de imagens pelo *software* Image-Pro Plus 6.0, mostrando a delimitação da área sinovial avaliada (verde) e a marcação do RAGE.

3.5. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE TGF- β , CTGF, IL-4, IL9 E IL17

As reações de imunohistoquímica para TGF- β , CTGF, IL-4, IL9 e IL17 foram feitas em cortes histológicos de 3 μ m do tecido sinovial de ratos diabéticos e controles, previamente aderidos em lâminas tratadas com *3-aminopropiltriethoxy Silano* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Após desparafinização dos cortes pela imersão das lâminas em xilol aquecido, a 60°C por 30 minutos, e xilol à temperatura ambiente, estes foram reidratados por sucessivas lavagens em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-75%), seguido de lavagem em água corrente, por 10 minutos, em água destilada e tampão PBS (15 minutos). A recuperação antigênica foi específica para cada um dos marcadores estudados. Como mostra a **tabela 3**.

Tabela3. Padronização da imuno-histoquímica para detecção dos marcadores

Marcador	Digestão	Bloqueio sítios inespecíficos	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
ET-1	Tripsina 0,25% 20 min em estufa 37°C	Água oxigenada 30 volumes (7 lavagens de 5 min) + leite desnatado 5% (30 min)	Anti ET-1 policlonal obtido em cabra; 1:150 (cód.: sc 21625, Santa Cruz Biotechnology Inc)	<i>ABCKit</i> <i>Vectastain</i> (<i>Vector Elite</i> PK- anti-cabra- Burlingame, CA, EUA)
TGF- β	Panela a vapor 20 min a 37°C	Água oxigenada 30 volumes (7 lavagens 5 min)	Anti TGF β policlonal obtido em cabra 1: 100 (Cód.: sc 31608, Santa Cruz Biotechnology Inc)	<i>ABCKit</i> <i>Vectastain</i> (<i>Vector Elite</i> PK- anti-cabra- Burlingame, CA, EUA)
IL-1	Proteinase k 15 minutos em estufa 37°	Água oxigenada 30 volumes (7 lavagens de 5 min) + leite desnatado 5% (30 min)	Anti IL-6 policlonal obtido em coelho(Santa Cruz Biotechnology Inc)	<i>ABCKit</i> <i>Vectastain</i> (<i>Vector Elite</i> PK- anti-cabra- Burlingame, CA, EUA)
IL-6	Proteinase k 15 minutos em estufa 37°	Água oxigenada 30 volumes (7 lavagens de 5 min) + leite desnatado 5% (30 min)	Anti IL-6 policlonal obtido em coelho(Santa Cruz Biotechnology Inc)	<i>ABCKit</i> <i>Vectastain</i> (<i>Vector Elite</i> PK- anti-cabra- Burlingame, CA, EUA)
IL-17	Proteinase k 15 minutos em estufa 37°	Água oxigenada 30 volumes (7 lavagens de 5 min) + leite desnatado 5% (30 min)	Anti IL-17 policlonal obtido em coelho (Santa Cruz Biotechnology Inc)	<i>ABCKit</i> <i>Vectastain</i> (<i>Vector Elite</i> PK- anti-cabra- Burlingame, CA, EUA)

3.5.2. Morfometria do TGF- β

Para a avaliação da imunomarcação do TGF- β no tecido sinovial foi utilizado o método estereológico do *point-counting*, que consiste num retículo contendo 100 pontos e cinquenta retas⁶⁷. A avaliação foi realizada por observador, às cegas, em 10 campos randomizados do tecido sinovial, em aumento de 400X. A porcentagem (P) de pontos marcados no compartimento de referência para cada antígeno estudado foi expressa conforme a fórmula: $P = (Pi \times 100) / Pt$; sendo Pi, o número de pontos que incide sobre a marcação positiva por imunohistoquímica e Pt, o número total de pontos analisados. A porcentagem (P) de cada antígeno foi calculada a partir da soma dos resultados de todos os campos analisados para cada amostra (**Figura12**).

Figura 15. Imagem representativa do método estereológico de contagem de pontos por meio de um retículo adaptado ao microscópio convencional.

3.6. REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA COM AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

3.6.1. Extração de RNA

O RNA total foi extraído de cerca de 5 mg de tecido sinovial congelado e pulverizado com *Biopulverizer* (Bio-Pulverizer BioSpec Products Inc., Oklahoma, EUA), pelo método de Chomezynski e Sacchi⁶⁷, utilizando o reagente TRIZOL[®] (Invitrogen Co, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Para separação do RNA, as amostras do tecido imerso no TRIZOL[®] foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente; em seguida, após adição de 200µl de clorofórmio, as amostras foram rapidamente agitadas, mantidas à temperatura ambiente por 3 minutos e submetidas à centrifugação (12.000 rpm), por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um tubo novo. Para a precipitação do RNA, foram adicionados 500µl de álcool isopropílico às amostras, as quais foram homogeneizadas por inversão e mantidas no freezer à -20°C por um período de 12 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA diluído em 1ml de etanol (85%) e submetido a nova centrifugação (5 minutos/2.500 rpm/ 4°C). Por fim, o RNA foi dissolvido em 20µl de H₂O deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPEC; Merck, Alemanha), que constitui um forte inibidor de ribonuclease. A avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA foi feita em espectrofotômetro (Nano Vueplus; GE), a partir de 2µl das amostras de RNA dissolvidas em H₂O DEPEC. Para obtenção de RNA com alto grau de pureza, a relação entre as leituras obtidas nos comprimentos de onda 260nm e 280nm deve estar entre 1,7 e 2,0.

3.6.2. Reação em cadeia da polimerização em tempo real (qRT-PCR)

Para a reação de qRT-PCR foram selecionados 6 genes de interesse, específicos para ratos (**Tabela 4**). As sequências dos genes foram adquiridas pelo site www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. Para a montagem do mapa gênico da sequência escolhida foi utilizado o software localizado no endereço eletrônico www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgbeat

Tabela 4 – Sequência e descrição dos genes selecionados para o estudo.

Gene	Sense 5' → 3'	Antisense 5' → 3'
GAPDH	ATGATTCTACCCACGGCAAG	CTGGAAGATGGTGATGGGTT
COLI	CAACAGACTGGCAACCTCAA	GGAGGTCTTGGTGGTTTTGT
COLIII	CCTACATGGATCAGGCCAAT	TGTCTTGCTCCATTACACCAG
COLV α_1	CAGGCAGCTACGATAAGGCTAT	ACTTTGGGCGTGTCAATCTC
COLV α_2	CCTCAAGAAAGCTGTGGTTC	GGCCACATTCTGTGTTCTGT

A expressão dos genes foi avaliada por PCR em tempo real utilizando o equipamento Step One (Applied Biosystems – Foster City, CA – USA) com o kit Super Script III Platinum SYBR® Green One-Step qRT-PCR (11736051-Life Technologies). Cada reação foi realizada com 15µl, contendo 1,45µl de água deionizada estéril; 7,5µl da mistura de reação 2XSYBER® Green; 0,3 µl de cada *primer* a 10nM; 0,3 µl de Super Script III RT/Platinum Taq Mix; 0,15 µl de ROX Reference Dye e 5µl de RNA total a 20ng/ml. Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto a amostra). A análise da expressão gênica foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, usando o gene da GAPDH como controle interno.

As reações de qRT-PCR foram padronizadas com o intuito de encontrar a melhor temperatura de anelamento para cada gene em estudo. Desta forma um único pico de fluorescência foi detectado para cada gene. Os tamanhos dos fragmentos gerados pelo qRT-PCR foram conferidos em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo.

As condições de ciclagem para todos os genes foram as seguintes: 50°C por 10 minutos (para síntese de cDNA), seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Foi realizada curva de *melting* (fusão) para cada gene para verificação e certificação de um único pico de fluorescência para cada amostra analisada.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise entre as medidas obtidas, média e desvio padrão foram utilizados como medida de tendência central e variabilidade devido à tendência de distribuição normal da amostra. Histogramas e o teste de Shapiro-Wilk foram utilizados para verificação da simetria de distribuição dos dados. Quando os valores obtidos eram considerados normais testes paramétricos foram utilizados, como o “*t*” Student. Para valores não paramétricos foi adotado o teste de Teste de Mann-Whitney. Nas comparações entre os tempos para a mesma variável, quando necessário, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste a posteriori de Tukey considerando estatisticamente significativo um valor de $p < 0,05$ (SPSS Inc; Illinois, USA) e Graphpad prism 4.1 (CA 92037 USA).

4. RESULTADOS

4. 1. DIABETES EXPERIMENTAL

Após a infusão da estreptozotocina os animais considerados diabéticos apresentaram valores de glicemia acima de 200 mg /dl, enquanto o valor normal da taxa glicêmica é em torno de 100mg/ml. Adicionalmente, foi observado aumento da concentração de anti-CML plasmática e progressiva perda de peso nos animais dos grupos diabéticos em relação aos dos grupos controle. (**Tabela 5**). Foram ainda observadas durante o experimento a presença de polidipsia e poliúria em todos os animais do grupo diabético, reproduzindo os sintomas clássicos do diabetes descompensado.

Tabela 5. Características gerais dos animais após indução do diabetes

Tempo de indução	1dia	7dias	30dias	60dias
<i>Peso corporal (g)</i>				
Controle	223±26	295±34	394±57*	460,46 ± 65,43
Diabetes	229,5±32	234±13	228±38	263± 19,97*
<i>Glicemia (mg/dl)</i>				
Controle	75,8±7,4	121±20*	95±12,3*	97,46±6,7
Diabetes	78,3±6,7	382,75±54	565±211	377 ±37,53*
<i>Anti-CML plasmático(ng/ml)</i>				
Controle	-----	-----	-----	1,55 ± 0,61
Diabetes	-----	-----	-----	2,88 ±1,05*

Valores representam a média ± desvio padrão (* $p < 0,05$ comparado aos controles)

4.2. REMODELAMENTO DA SINOVIA NO DIABETES EXPERIMENTAL

4.2.1. Alterações estruturais no tecido sinovial decorrem de comportamento anormal dos diferentes tipos de colágenos

4.2.1.1. Aumento progressivo do colágeno total nos vasos e tela sub sinovial

Nos grupos controle, a tela sub sinovial, que é composta principalmente por tecido adiposo, manteve-se íntegra e homogênea (**Figura 16- A, C e E**), assim como nos vasos (**Figura 17- A, C e E**). Entretanto, nos grupos diabéticos, notou-se espessamento progressivo dos compartimentos sinoviais, com substituição espacial da camada de tecido adiposo por fibras do colágeno, ressaltando-se que tais modificações iniciam-se próximos aos vasos sub sinoviais, expandindo-se para os tecidos subjacentes, com formação de uma rede homogênea das fibras de colágeno, que culminam na obliteração total dos compartimentos (**Figura 16- B, D e F**).

Na análise do tecido sinovial através da coloração de Picrosírius, em microscópio convencional, foi possível avaliar a mudança na estrutura dos compartimentos sinoviais, corroborando com as alterações descritas pela coloração de H&E. Ainda foi notado um intenso processo de remodelamento das fibras de colágeno no grupo diabético quando comparamos com o seu respectivo controle (**Figura 18-A-E**). Estas alterações apresentaram-se mais intensas e expressivas na tela sub sinovial e na parede dos vasos (**Figura 19 A-E**) (**Tabelas 6, 7 e 8**). A fração de área em % ocupada pelas fibras colágenas nos vários compartimentos sinoviais, ao longo do tempo de indução do diabetes, pode ser observada nas **Tabelas 6, 7, 8**. Adicionalmente, foi observado um aumento significativo do colágeno nos três compartimentos sinoviais referentes aos 30 e 60 dias após indução do diabetes, indicados nas **Figuras 20, 21 e 22**.

Figura 16 - Cortes histológicos do tecido sinovial corados com hematoxilinaeosina (A-F). Nos casos controles, verificam-se (**setas**) a membrana sinovial, tecido sub-sinovial e vasos, perfeitamente preservados (**A, C e E**). Porém, nos casos dos grupos diabéticos (**B, D e F**), podemos observar mudanças na característica do tecido sinovial. O início do espessamento dos vasos sinoviais (**seta**) pode ser visualizado no grupo diabético de 7 dias (**B**), se intensificando com o decorrer dos tempos de indução (**D e F**), ocorrendo substituição da camada de tecido gorduroso por tecido fibroso (**setas**), tanto na membrana sinovial como na tela subsinovial quando comparado ao controle. (**aumento 200X**)

Figura 17 - Cortes histológicos do tecido sinovial corados com hematoxilinaeosina. (A-F). A figura demonstra a diferença estrutural entre os vasos dos grupos controles (A, C e E, setas) e diabéticos (B, D e F, setas). O espessamento dos vasos iniciam-se no grupo de 7 dias (B, setas) e intensificam-se nos seguintes. (D e F, setas) (aumento 400x)

Figura 18 - Cortes histológicos do tecido sinovial corados com Picrosirius (A-F). Nos casos controle, nota-se a membrana sinovial, o tecido sub-sinovial e vasos, perfeitamente preservados, com distribuição normal das fibras colagênicas nos compartimentos sinoviais (A, C e E). Porém, nos casos diabéticos (B, D e F), podemos observar aumento progressivo das fibras de colágeno, caracterizando a mudança na característica do tecido sinovial. Essa deposição aumentada pode ser observada inicialmente, nos vasos sinoviais (**seta**) e tecidos adjacentes a ele (B), com o aumento do tempo de indução verifica-se (**setas**) intensa deposição fibrótica nos compartimentos sinoviais (D e F), quando comparado ao controle. (aumento 200x)

Figura 19 - Cortes histológicos do tecido sinovial corados com Picrosirius (**A-F**). Nos casos controle, nota-se vasos, perfeitamente preservados, com distribuição normal das fibras colagênicas (**A, C e E**). Porém, nos casos diabéticos (**B, D e F**) há aumento progressivo das fibras de colágeno com o avanço do tempo de indução, caracterizando a mudança na característica do vaso sinovial (**setas**). (aumento 400x)

As tabelas representam o colágeno total (%) encontrado em cada compartimento sinovial analisado por *point-counting*, e são ilustrados graficamente, em seguida, por *Box blot* correspondente a cada tabela.

Tabela 6. Morfometria do colágeno total presente na membrana sinovial de ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução (dias)	7	30	60
<i>Fibras de colágeno (%)</i>			
Controle	1,167±0,4	0,83±0,16	0,01±0,02
Diabetes	1,30±0,47	3,706±1,7*	3,8±0,5*

Valores representam a média ± desvio padrão(**p* < 0,05 comparado aos controles)

Tabela 7. Morfometria do colágeno total presente no compartimento sub sinovial de ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução(dias)	7	30	60
<i>Fibras de colágeno (%)</i>			
Controle	16,67±4,4	17±8,5	20,33±10,84
Diabetes	25,8±4,06	64±7,55*	76±7,23*

Valores representam a média ± desvio padrão(**p* < 0,05 comparado aos controles)

Tabela 8. Morfometria do colágeno total presente nos vasos sinoviais de ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução(dias)	7	30	60
<i>Fibras de colágeno (%)</i>			
Controle	5,91±1,3	7,58±0,98	8,2±0,5
Diabetes	17,44±2,3*	27,42±0,68*	32±7,4*

Valores representam a média ± desvio padrão(**p* < 0,05 comparado aos controles)

Figura 20 – *Box Plot* mostrando a porcentagem de fibras grossas e finas na membrana sinovial de ratos diabéticos em relação a seu respectivo controles (**Tabela 6**).

Figura 21 – *Box Plot* mostrando a porcentagem de fibras grossas e finas do compartimento sub sinovial de ratos diabéticos em relação ao respectivo controle. (**Tabela 7**)

Figura 22 – *Box Plot* mostrando a porcentagem de fibras grossas e finas nos vasos sinovial de ratos diabéticos em relação ao respectivo controle. (Tabela 8)

4.2.1.2. Aumento progressivo de fibras grossas do colágeno nos vasos e tela sub sinoviais

Após os resultados encontrados no Picrosírius, em microscópio convencional, referente ao aumento das fibras totais de colágeno nos compartimentos sinoviais dos grupos diabéticos, foi realizada análise quantitativa do tecido sinovial, em luz polarizada, que permitiu diferenciar os tipos de fibras (grossas e finas) que estariam envolvidas neste processo, sabendo que o tecido sinovial é composto principalmente por fibras finas (birrefringência verde-amarelado). Como resultado, notou-se aspecto normal e manutenção da proporção de fibras grossas (birrefringência vermelho-alaranjado) e finas (birrefringência verde-amarelado) nos grupos controles. Nos animais diabéticos houve aumento progressivo das fibras grossas (**Figura 23, B, D e F**), principalmente nos vasos (**Figura 24**), quando comparado aos respectivos controles, porém esse aumento foi acompanhado inicialmente pelas fibras finas. Entretanto esse aumento não foi mais observado no grupo de animais após 60 dias de indução da indução do diabetes, que apresentou predomínio evidente das fibras grossas (**Tabela 9 e 10**) (**Figura 25, 26**).

Figura 23. Cortes histológicos do tecido sinovial corados com Picrosirius (**A-F**), sob luz polarizada. Na figura observa-se (**setas**) manutenção da proporção basal de fibras finas(birrefringência verde-amarelado) e grossas (vermelho-alaranado) nos grupos controle (**A, C e E**), contudo, nos grupos diabéticos (**B, D e F**) é possível notar (**setas**) progressivo aumento das fibras grossas e finas nos vasos e tecido sub sinovial já nos grupos de 7 dias e 30 dias(**B e D**), após este período há o predomínio quase que exclusivamente de fibras grossas no grupo diabético (**F**) quando comparado ao respectivo controle.(**aumento 400x**)

Figura 24. Cortes histológicos do tecido sinovial corados com Picrosirius (**A-F**) sob luz polarizada. Na figura destacam-se os vasos sinoviais e observa-se (**setas**) manutenção da porcentagem de fibras finas (birrefringência verde-amarelado) e grossas (birrefringência vermelho-alaranjado) nos grupos controles (**A, C e E**), entretanto, nos grupos diabéticos (**B, D e F**) já é possível notar (**setas**) progressivo aumento das fibras grossas e finas que circundam o endotélio vascular nos grupos de 7 dias e 30 dias(**B e D**), após este período há o predomínio quase que exclusivamente de fibras grossas (**F**) quando comparado ao, respectivo, grupo controle.(**aumento 400x**)

Tabela 9. Porcentagem de colágeno de fibras finas e grossas no tecido sinovial de ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução (dias)	7	30	60
<i>Fibra fina (%)</i>			
Controle	8,39±1,79	7,4±0,09	5,39±1,53
Diabetes	9,513±0,78	16,71±0,66*	2,40±0,21*
<i>Fibra grossa (%)</i>			
Controle	2,40±0,89	3,67±1,34	4,45±0,83
Diabetes	2,53±0,52	19,56±3,95*	16,70±0,66*

Valores representam a média ± desvio padrão (* $p < 0,05$, comparado aos controles)

Tabela 10. Porcentagem de colágeno de fibras finas e grossas no vaso sinovial de ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução (dias)	7	30	60
<i>Fibra fina (%)</i>			
Controle	12,9±1,09	22,13±0,39	17,13±0,95
Diabetes	10,271±1,4	37,34±0,58*	5,98±0,21*
<i>Fibra grossa (%)</i>			
Controle	7,94±0,08	9,6±0,54	8,45±0,83
Diabetes	10,9±0,62	47,18±0,3*	42,70±0,66*

Valores representam a média ± desvio padrão (* $p < 0,05$, comparado aos controles)

Figura 25 – Box Plot mostrando a porcentagem de fibras grossas e finas no tecido sinovial de ratos diabéticos em relação ao controle. (Tabela 9)

Figura 26 – Box Plot mostrando a porcentagem de fibras grossas e finas do vaso sinovial de ratos diabético em relação ao controle.(**Tabela 10**)

4.2.1.3. Relação entre a expressão de fibras do colágeno I, III e V

A imunofluorescência foi realizada para os diferentes tipos de colágeno, por serem estes componentes do tecido estudado e por suas características particulares, na tentativa de definir quais os tipos responsáveis pelos resultados encontrados anteriormente, em luz polarizada, e de que maneira estariam envolvidos na fisiopatologia do acometimento sinovial.

A **Figura 27** demonstra a imunoexpressão do colágeno I, na sinóvia de ratos controle e diabéticos. Tais achados corroboram com os resultados anteriormente descritos na quantificação das porcentagens de fibras grossas e finas, através da coloração de Picrosírius. Nota-se a manutenção da expressão basal do colágeno I nos grupos controle (**A, C e E**). Em contraste, nos grupos diabéticos (**B, D e F**) observou-se aumento expressivo e progressivo da expressão do colágeno I nos compartimentos sinoviais, demonstrando correlação direta com o aumento na proporção de fibras grossas, responsáveis por processos fibróticos no tecido sinovial. Nos grupos de 30 e 60 dias esta diferença foi significativa quando comparado ao respectivo controle. (**Tabela 11, Figura 28**)

A **Figura 29** demonstra a presença do colágeno III, evidenciada por imunofluorescência, na sinóvia de ratos controle e diabéticos. O COLIII, também tem grande importância na confirmação dos resultados descritos anteriormente, relacionados à porcentagem dos tipos de fibras no tecido sinovial. Nos grupos controle, pode-se observar a manutenção da expressão basal do colágeno III (**A, C e E**). Entretanto, nos grupos diabéticos (**B, D e F**) foi notado aumento na expressão desta proteína que decresce progressivamente após os primeiros 30 dias de indução, tal comportamento parece ser uma tentativa compensatória das fibras finas em resposta ao aumento acentuado das fibras grossas (COLI) nos compartimentos sinoviais, sendo significativa a diferença entre os grupos de 60 dias (**Tabela 12, Figura 30**).

Ainda, através da imunofluorescência no tecido sinovial de ratos controle e diabéticos, foi possível avaliar e quantificar a imunomarcagem do colágeno V, como mostra a **Figura 31**. Tais achados reafirmam os resultados anteriormente descritos, referente às quantificações das fibras totais e diferenciadas através da coloração de Picrosírius. Nos grupos controle pode-se observar a manutenção da expressão basal do

colágeno V (**A, C e E**). Em contraste, nos grupos diabéticos (**B, D e F**) nota-se aumento expressivo em 30 dias de indução em relação aos respectivos controles, sendo este aumento semelhante ao encontrado na avaliação do colágeno tipo III, todavia sua expressão, de maneira geral, decresce nos compartimentos sinoviais, porém ainda é possível observar sua expressão nos vasos (**F, seta**). Nos grupos de 30 e 60 dias esta diferença foi significativa quando comparados ao seu respectivo controle (**Tabela13, Figura 32**).

Figura 27. Imunofluorescência do tecido sinovial de rato imunomarcado com anti-colágeno I (A-F). Em (A, C e E) nota-se (**setas**) que a expressão do colágeno tipo I não se altera de maneira acentuada com o avanço do tempo de estudo nos grupos controles, ao contrário dos casos diabéticos (B, D e F) que demonstram aumento na expressão de maneira progressiva. A expressão do colágeno I, inicialmente, destaca-se próxima aos vasos subsinoviais (B e D, **setas**) até se acentuar de maneira contínua na membrana e tela subsinovial (D e F, **setas**), evidenciando uma progressiva e notória diferença na imunoexpressão entre os grupos controle (A,C e E) e diabético (B, D e F), consequentemente, entre os próprios grupos diabéticos (B, D e F). (aumento 400x)

Tabela 11. Quantificação da expressão da fibra de colágeno tipo I na sinóvia de ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução (dias)	7	30	60
<i>Expressão da fibra de colágeno I (%)</i>			
Controle	8,5±3,5	9,21±0,76	12,05±3,10
Diabetes	13,23±6,14	18,60±2,30*	25,15±5,45*

Valores representam a média ± desvio padrão(* $p < 0,05$ comparado aos controles)

Figura 28– Box Plot sobre porcentagem da expressão da fibra de colágeno tipo I, na sinóvia de ratos diabéticos e controle.

Figura 29. Imunofluorescência na sinovia de rato, imunomarcada com anti-colágeno III (A-F). Em (A, C e E) nota-se (**setas**) que a expressão do colágeno tipo III não se altera de forma anormal nos grupos controle, ao contrário dos casos diabéticos (B, D e F) que demonstram aumento na imunoexpressão até 30 dias (**B e D, setas**), com acentuado, e significativo, decréscimo no grupo de 60 dias (**F, setas**). (aumento 400x)

Controle

Diabetes

7 dias

30 dias

60 dias

Tabela 12.Quantificação referente a expressão das fibras de colágeno tipo III, após imunomarcacão do tecido sinovial de ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução (dias)	7	30	60
Expressão do colágeno I (%)			
Controle	9,59 ±1,08	12,06±1,62	8,7 ±2,4
Diabetes	14,20±2,99	14,38±1,42	4,59±1,2*

Valores representam a média ± desvio padrão(* $p < 0,05$ comparado aos controles)

Figura 30 – Box Plot sobre porcentagem da expressão da fibra de colágeno tipo III, na sinóvia de ratos diabéticos e controle.

Figura 31. Imunofluorescência no tecido sinovial de ratos imunomarcado com anti-colágeno V (A-F). Em (A, C e E) nota-se (**setas**) que a expressão do colágeno tipo V se mantém basal nos grupos controle, ao contrário dos casos diabéticos (B, D e F) que demonstram aumento na imunoexpressão até 30 dias (B e D, **setas**), com acentuado, decréscimo no grupo de 60 dias (F, **setas**).

Tabela 13. Quantificação referente a expressão das fibras de colágeno tipo V, após imunomarcção do tecido sinovial de ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução (dias)	7	30	60
<i>Expressão do colágeno V (%)</i>			
Controle	6,75 ±2,30	5,04±0,47	6,75±0,8
Diabetes	6,22±2,59	19,78±1,74*	3,25±1,5*

Figura 32 – Box Plot sobre porcentagem da expressão da fibra de colágeno tipo V, na sinóvia de ratos diabéticos e controle.

4.2.2. Alterações bioquímicas e funcionais no tecido sinovial são decorrentes de comportamento anormal de colágenos e proteínas

4.2.2.1. Aumento do colágeno total através da 4-Hidroxirolina

Assim como nas técnicas realizadas anteriormente, a dosagem da 4-hidroxirolina teve como objetivo aclarar sobre um ponto importante, no que se refere a todo o remodelamento visto com os resultados até agora apresentados, ou seja, se esta modificação na estrutura do tecido sinovial com remodelamento das fibras, diminuição das fibras finas (COLV) e aumento nas fibras grossas (COLI), resultaria de fato no aumento ou diminuição do colágeno total presente nesta estrutura. Os resultados revelam que este remodelamento altera de forma significativa o conteúdo sinovial como visto na **tabela 13 e figura 33**, compondo mais um elemento importante neste entendimento fisiopatológico.

Tabela 14. Quantificação da 4-hidroxiprolina presente no tecido sinovial de ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução (dias)	7	30	60
<i>Proteína total (%)</i>			
Controle	19±3,19	45,6±2,3	50,65±21,88
Diabetes	21,4±2,64	202,5±34,64*	177,5±37,34*
Valores representam a média ± desvio padrão(* $p < 0,05$ comparado aos controles)

Figura 33– Box Plot mostrando a porcentagem de 4-hidroxiprolina no tecido sinovial do grupo diabético em relação ao grupo controle correspondente.

4.2.2.2. Aumento dos produtos de glicação e seus receptores

Após estabelecer as modificações estruturais no tecido sinovial ocasionadas por comportamento anormal dos diferentes tipos de colágenos, a próxima etapa foi estudar os principais processos envolvidos nas complicações diabéticas e seus precursores como os produtos de glicação avançada e seus receptores.

A **Figura 34** demonstra a imunomarcagem do receptor de AGE, evidenciada por imunofluorescência na sinóvia de ratos controle e diabéticos. Nos grupos controles (**A, C e E**) a expressão deste receptor foi praticamente imperceptível (**setas**) nos três tempos avaliados. Em contraste, nos grupos diabéticos (**B, D e F**) nota-se aumento expressivo e progressivo de sua expressão nos compartimentos sinoviais. Os achados desta imunoexpressão ajudam a esclarecer um dos possíveis motivos que ocasionariam alterações dos colágenos sinoviais, bem como sua alteração na interação com outras estruturas da matriz extracelular. (**tabela 14, figura 36**)

Os achados da imunodeteção do CML corroboram com os resultados encontrados anteriormente, referente à expressão dos receptores de AGE. A **Figura 35** demonstra a imunoexpressão da CML, evidenciada por imunofluorescência, no tecido sinovial de ratos controle e diabéticos. Através desta figura, pode-se observar a manutenção da expressão basal da CML, que praticamente não se expressa em tecido normais, como visto nos grupos controle (**A, C e E, setas**). Todavia, nos grupos diabéticos (**B, D e F**) nota-se aumento significativo nos diferentes componentes, estabelecendo possível correlação com a diminuição de fibras finas e aumento na proporção de fibras grossas responsáveis por processos fibróticos no tecido sinovial.

Figura 34. Imunofluorescência do tecido sinovial de rato imunomarcada com anti-RAGE (A-F). Em (A, C e E) nota-se (**setas**) que a expressão do RAGE praticamente esta ausente (**setas**), ao contrário dos casos diabéticos (B, D e F) que demonstram aumento na imunomarcagem de maneira progressiva. A expressão do RAGE, inicialmente, destaca-se próximo aos vasos subsinoviais (B, **setas**) até a expressão continua na membrana e tela subsinovial (D, **setas**), se estabilizando e até decrescendo no grupo de 60 dias (F, **setas**), evidenciando uma progressiva e notória diferença na imunoexpressão entre os grupos controle (A,C e E) e diabético (B, D e F), consequentemente, entre os próprios grupos diabéticos (B, D e F). (400x)

Figura 35. Imunofluorescência do tecido sinovial de rato imunomarcada com anti-CML(A-F). Em (A, C e E) nota-se (**setas**) que a expressão da CML é praticamente inexistente e não se altera com o avanço do tempo de estudo nos grupos controle, ao contrário dos casos diabéticos (B, D e F) que demonstram aumento na imunomarcagem de maneira progressiva. A expressão da CML, inicialmente, destaca-se próxima aos vasos subsinoviais (B e D, **setas**) até a expressão continua na membrana e tela subsinovial (D e F, **setas**), evidenciando uma progressiva e notória diferença na imunoexpressão entre os grupos controle (A,C e E) e diabético (B, D e F). (400x)

Tabela 15. Quantificação referente à expressão do receptor de AGE após imunomarcação do tecido sinovial de ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução (dias)	7	30	60
<i>Expressão do RAGE (%)</i>			
Controle	1,2±0,8	2,04±0,9	2,57±0,69
Diabetes	13,94±1,5*	20,14±2,30*	7,15±2,49*

Valores representam a média ± desvio padrão (* $p < 0,05$ comparado aos controles)

Figura 36 Box Plot sobre a porcentagem da expressão do RAGE na sinóvia de ratos diabéticos e controle.(figura 34)

Tabela 16. Quantificação referente à expressão da CML, após marcação do tecido sinovial de ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução (dias)	7	30	60
<i>Expressão da CML (%)</i>			
Controle	0,9±1,75	1,3 ±0,98	1,3 ±0,5
Diabetes	10,12±1,75*	18,02±2,34*	13,47±2,3*

Valores representam a média ± desvio padrão(* $p < 0,05$ comparado aos controles)

Figura 37 – Box Plot sobre porcentagem da expressão da CML, na sinóvia de ratos diabéticos e controle.(figura35)

4.2.2.3. Aumento de citocinas pró-fibróticas

A imunohistoquímica de detecção tem papel fundamental no entendimento dos mecanismos que desencadeiam os processos pró-fibróticos até agora descritos. Foi visto que, o processo provavelmente inicia-se nos vasos, portanto se fez necessário avaliar os possíveis fatores que estimulariam este endotélio a ativar a síntese na matriz extracelular e quais proteínas ou fatores se encontrariam expressos, para isso foram padronizadas as reações de imuno-detecção e seus primeiros resultados seguem abaixo.

Na **figura 38** observa-se no grupo diabético a expressão da ET-1 no endotélio vascular e em algumas regiões da tela subsinovial, em contrapartida não é possível observar o mesmo no controle (A). Na marcação com IL-17 (C e D) também nota-se (setas) o predomínio da expressão próximo ao vaso, estabelecendo correlação com a ativação do endotélio.

Na **figura 39** observa-se que a expressão do TGF- β é praticamente inexistente e não se altera com o avanço do tempo de estudo nos grupos controle, ao contrário dos casos diabéticos (**B, D e F**) que demonstram aumento na imunomarcação de maneira progressiva. A expressão da TGF- β , inicialmente, destaca-se próxima aos vasos subsinoviais evidenciando uma progressiva e notória diferença na imunoexpressão entre os grupos controle (**A, C e E**) e diabético (**B, D e F**). Tais diferenças foram significantes quando comparado os grupos controles e diabéticos (**Tabela 16 e 17**)

Figura 38 .Expressão de endotelina-1 (**seta**) no endotélio vascular da sinóvia dos animais controle (**A**) e diabéticos (**B**). Expressão da IL-17(**seta**) na sinóvia dos animais controle (**D**) e diabéticos (**C**). Aumento: **400x**

Figura 39. Cortes histológicos do tecido sinovial de rato imunomarcado com anti-TGF- β (A-F). Em (A, C e E) nota-se (**setas**) que a expressão do TGF- β é praticamente inexistente e não se altera com o avanço do tempo de estudo nos grupos controle, ao contrário dos casos diabéticos (B, D e F) que demonstram aumento na imunomarcacão de maneira progressiva. A expressão da TGF- β , inicialmente, destaca-se próxima aos vasos subsinoviais (B e D, **setas**) até a expressão continua na membrana e tela subsinovial (D e F, **setas**), evidenciando uma progressiva e notória diferença na imunoexpressão entre os grupos controle (A,C e E) e diabético (B, D e F).

FIGURA 40. Imunomarcção do tecido sinovial de rato com TGF- β (A-F). Em (A, C e E) nota-se (**setas**) que a expressão da TGF- β é praticamente inexistente nos vasos sinoviais e não se altera com o avanço do tempo de estudo nos grupos controle, ao contrário dos casos diabéticos (B, D e F) que demonstram aumento na imunomarcção dos vasos maneira progressiva, iniciando com uma linha tênue que circunda o epitélio vascular (B, D, setas) até expressão nos tecidos adjacentes ao vaso (F, setas)

Tabela 18. Quantificação da expressão do TGF- β no tecido sinovial em ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução (dias)	7	30	60
TGF-β (%)			
Controle	0,12 $\pm$ 0,15	0,34 $\pm$ 0,33	0,38 $\pm$ 0,05
Diabetes	5,2 $\pm$ 1,02*	11,67 $\pm$ 2,72*	6 $\pm$ 0,9*

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão(* $p < 0,05$ comparado aos controles)

Figura 41 – Box Plot sobre a porcentagem de TGF- β expresso no tecido sinovial de ratos diabéticos e controles.

Tabela 19. Quantificação da expressão do TGF- β no tecido sinovial em ratos diabéticos e controle.

Tempo de indução (dias)	7	30	60
TGF-β (%)			
Controle	1,35 $\pm$ 0,21	2,34 $\pm$ 0,02	3,01 $\pm$ 0,005
Diabetes	7,13 $\pm$ 1,76*	16,5 $\pm$ 3,66*	21,33 $\pm$ 1,33*

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão(* $p < 0,05$ comparado aos controles)

Figura 42 – *Box Plot* representando a porcentagem de TGF- β expresso no vaso sinovial de ratos diabéticos e controles.

4.2.3. Alterações gênicas no tecido sinovial induzem comportamento anormal dos diferentes tipos de colágenos

4.2.3.1. A expressão gênica do colágeno I e III e cadeias α do colágeno V

O mRNA total extraído de tecido sinovial de ratos diabéticos e controles, foi utilizado para avaliar a expressão de RNA das cadeias α de COLI, COLIII e COLV, por meio de RT-PCR em tempo real. Devido à utilização de grande parte do material sinovial para a padronização da reação e dos primers, neste primeiro momento foi utilizado um número de casos relativamente baixo de cada grupo, exatamente por isto não foi imposto nenhum teste estatístico sobre os resultados, por não se ter um intervalo de confiança adequado para tal avaliação, porém abaixo se são demonstrados graficamente os resultados preliminares da expressão destes genes avaliados.

No gráfico 1, nota-se aumento na expressão do COLI no grupo de 7 dias em relação ao controle e grupo de 60 dias, o mesmo ocorre com o COLIII (Gráfico 2), já no gráfico 3, observam-se dois comportamentos distintos entre as cadeias do COLV, a expressão da $\alpha 2$ no grupo de sete dias é superior ao controle e grupo 60 dias, enquanto o contrario ocorre com a cadeia $\alpha 1$ do próprio COLV.

Gráfico 1- Quantificação por RT-PCR em tempo real dos genes das cadeias α dos colágenos I obtidos do tecido sinovial de ratos diabéticos e controles

Gráfico 2- Quantificação por RT-PCR em tempo real dos genes das cadeias α do colágeno III, obtidos do tecido sinovial de ratos diabéticos e controles.

Gráfico 3- Quantificação por RT-PCR em tempo real dos genes das cadeias α dos colágenos V

5. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo referem-se ao comprometimento precoce do tecido sinovial, ficou evidenciado que o remodelamento se inicia ao redor dos vasos e é perpetuado ao longo da tela subsinovial. O COL I foi a proteína mais associada ao processo de fibrose tecidual, aumentando gradativamente como os produtos de glicação avançada.

Outro ponto relevante refere-se à rápida evolução patológica nesta estrutura, e nos remete a pensar em diversas formas de associação entre o processo fibrótico inerente a própria fisiopatologia do diabetes frente a hiperglicemia e a possível antecipação degenerativa intrínseca a etiologia do comprometimento articular na OA. Estes resultados ampliam a possibilidade em intervenções preventivas destes pacientes.

Como característica geral ficou evidenciada que as disfunções encontradas em nosso estudo anterior, nos componentes da capsula articular em diabéticos, estão associadas ao intenso remodelamento tecidual, que se inicia precocemente nos vasos sinoviais, e arredores, devido a mecanismos implícitos a patogênese do diabetes que serão discutidos a frente.³³

Sabe-se que em estado de hiperglicemia aguda, o organismo ativa respostas compensatórias para manutenção da homeostase e nutrição dos tecidos-alvo, porém a perduração de níveis hiperglicêmicos afeta substancialmente as reações intra e extracelularmente. Neste contexto, diversos mecanismos químicos e bioquímicos são desencadeados para compensar a ação da insulina e o aumento da glicose circulante, e proteínas que compõe este sistema, como os colágenos, são diretamente afetadas.^{11,12}

Na análise temporal da morfologia do tecido sinovial, foi possível observar que o início do processo se estabelece nos vasos e próximo a ele, esse espessamento característico da deposição colagênica desregulada esta associada às complicações descritas na literatura, frente ao acometimento macro e microvascular.^{20,21,22,26}

Giacco & brownlee (2010), descrevem que, na vigência de hiperglicemia, o aumento da metabolização da glicose na via glicolítica favorece a ativação da proteína quinase C, a qual medeia o potencial oxidante vascular. Forma-se, também, metilglioxal, importante intermediário na geração dos AGE, o que exacerba o estresse oxidante, que é apontado como importante elo na gênese das complicações tardias do diabete mellitu.

Atualmente, pesquisas que correlacionam precocemente os processos fibróticos à degeneração articular, como a osteoartrite (AO), não estabelecem uma linha

morfológica temporal definida, porém estudos celulares sobre expressão de possíveis biomarcadores como os receptores de AGE se assemelham aos resultados aqui encontrados no processo inicial do diabetes, e poderiam ser os precursores da alteração morfologia sinovial vista no grupo diabético de 7 dias.^{71,72,73}

Chang & Wu (2006)²⁶; Giacco e col (2010)⁶⁷ discorreram que o fluxo aumentado na via do poliol, gera consumo de substratos necessários à síntese de antioxidantes celulares, além de favorecer a modificação de macromoléculas por glicação, caracterizando a formação de produto Amadori ou frutossil-lisina nos vasos. E apesar da complicação vascular estar relacionada a quatro vias que remetem a mecanismos distintos, o resultado final sempre se expressa com aumento da interação dos RAGE e de AGE's circulantes como a CML, reforçando o que foi visto na presente pesquisa, onde se observou aumento progressivo destes marcadores através da imunofluorescência, relacionando-os a expressão de outros fatores desencadeantes de processos fibróticos.

Ainda nesta fase inicial, foi detectada por imunohistoquímica a presença da ET-1 e do TGF- β . Sabe-se que a ET-1 é um peptídeo essencial no controle da atividade do vaso e, sob condições normais, seus níveis são baixos, contudo, corroborando com nossos achados, foi descrito por diversos autores que em estados patológicos tais como o diabetes, hipertensão arterial pulmonar (HAP), e doenças do tecido conjuntivo (esclerodermia e fibrose pulmonar) seus níveis elevam-se de forma significativa ativando a síntese desordenada de fibroblastos ou miofibroblastos através de fatores de crescimento como o TGF- β .^{62,63,64} Esta forte associação entre os dois, foi confirmada recentemente por Martins e col (2012)⁷¹, que em seu estudo demonstrou que o TGF-B é um percursos na perpetuação da formação de fibroblastos e miofibroblastos, responsáveis por formar arranjos de fibras fibróticas apartir da expressão aumentada da ET-1.

Outro ponto muito importante também foi descrito por Martin e col (2012), sobre a expressão das cadeias alfa do COLV, principalmente da cadeia alfa dois, que foi relacionada a processos pró-fibróticos na ES precoce, enquanto a alfa 1 é relacionada a processos de frouxidão ligamentar em outro estudo ,indo de encontro ao resultado preliminar deste estudo⁷⁴.

Todos esses indícios iniciais formam processos que vão se intensificando com o aumento do tempo de indução, montando um quebra-cabeça no entendimento do processo que acomete a sinóvia diabética em comparação ao controle.

Após 30 dias os animais diabéticos demonstraram acentuada perda de peso, devido a fatores metabólicos e a glicogenólise dos tecidos e músculos como já é sabido na literatura.^{21,23} Os processos pró-fibroticos no tecido sinovial se intensificam e a histoarquitetura dos compartimentos se modifica drasticamente quando comparado ao controle e ao próprio grupo de diabetes de 7 dias.^{24,25}

Com o avanço no tempo de indução diabética, 30 dias, observa-se um processo intermediário de remodelamento, os quais foram se intensificando e atingindo compartimentos sinoviais importantes como a tela subsinovial, que por característica morfologia é composto principalmente por tecido adiposo e pequenos vasos com baixa densidade de fibras, entretanto nesta fase a conformação e proporção, entre tecido adiposo e densidade de fibras, na matriz extracelular se invertem, sendo visto tanto em análise morfológica (H&E) quanto quantitativa (Picrosírius).

Outro ponto importante é que há um aumento significativo do colágeno total (Picrosírius e HOP) em comparação ao controle, porém, curiosamente, esse resultado é reflexo do aumento proporcional dos dois tipos fibrilares (grossas e finas). Neste contexto, na literatura, isso também é visto em processos que possam culminar em fibrose tecidual como na ES^{73,74}, e em processos degenerativos como a ao,^{71,72,56,32}, que inicialmente, por fatores inflamatórios desencadeiam respostas através de citocinas que estimulam a formação inicial de tipos de colágenos, caracterizados como fibras finas, que irão fragilizar os tecidos afetados e posteriormente favorecer a instalação da fibrose propriamente dita.

Em seu estudo com ratos diabéticos, induzidos por estreptozotocina por dois meses, Atayde et al (2012)³³ demonstraram que nos tecidos subjacentes ao sinovial, como cartilagem e tendão, havia depósito excessivo de COLIII e COLV, corroborando com os presentes achados em imunofluorescência no grupo com 30 dias de indução. Todos esses fatores sugerem que o remodelamento encontrado tardiamente nas estruturas que compõe a capsula articular são vistas previamente no tecido sinovial, talvez por sua alta vascularização e forte exposição ao RAGE ligado ao AGE que desencadeiam a formação dos colágenos glicosados.

Nesta fase todos os processos inicialmente descritos no grupo de 7 dias se perpetuam ao longo do tecido de maneira significativa quando comparado ao controle, tanto na morfologia dos tecidos, quanto na imunomarcação específica das proteínas avaliadas, e esta tendência pró-fibrotica sinovial pode ser reafirmada a partir dos 60 dias de indução.

Na última fase de indução todos os fatores anteriormente descritos são estabelecidos, o tecido sinovial está totalmente remodelado, nota-se uma rede fibrilar de aspecto fibrótico homogêneo em todos os compartimentos sinoviais, o TGF- β encontra-se ainda expresso no tecido, indicando que a intensificação da fibrose ainda esteja ocorrendo, porém esse remodelamento já é caracterizado, quase que em sua totalidade, pela superexpressão do COLI, corroborando amplamente com o que é descrito na literatura para as mais variadas patologias com características fibróticas,^{28-33,39,60,65,74}, e ainda, confirmando o resultado encontrado por nosso grupo³³, no tecido sinovial com mesmo período de indução diabética.

A descrição temporal do acometimento sinovial no diabetes, além de caracterizar a evolução patogênica desta estrutura frente às complicações microvasculares desta doença, revela uma importante relação entre o diabetes e o processo desencadeante na limitação articular, e ainda, possibilita entender a necessidade de se estabelecer uma intervenção preventiva tanto farmacológica como fisioterapêutica na contenção dos processos limitantes músculo-esquelético presente nestes pacientes.

6.CONCLUSÃO

Através do estudo temporal da sinóvia, pudemos concluir que as alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares se iniciam de maneira precoce, decorrente do remodelamento acentuado e interação das proteínas da matriz com produtos de glicação avançada, principalmente intermediada pelo COLI. Tais mecanismos parecem ser desencadeados por eventos vasculares iniciais. Por esta razão, a continuidade na investigação dos mecanismos preditivos vasculares são fundamentais para o entendimento da sinoviopatia diabética.

7.REFERÊNCIAS

1. Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol.* 2003 Oct 15;66(8):1433-40
2. Oremus M, Postuma R, Griffith L, Balion C, Wolfson C, Kirkland S, Patterson C, Shannon HS; CLSA Algorithms Validation Group, Raina P. Validating Chronic Disease Ascertainment Algorithms for Use in the Canadian Longitudinal Study on Aging. *Can J Aging.* 2013 Aug 8:1-8. [Epub ahead of print]
3. Cunningham GR. Diabetes and cardiovascular disease: what have we learned in 2012? *Tex Heart Inst J.* 2013;40(3):290-2.
4. Murussi N; Witter V; Silveiro S.P. Diabetes Mellitus classification. *Arq. Brás. Cardiol.* 2010 Aug (dited 2010 Dec 27): 95(2): 40-46
5. Lindsa J. R., Kenne L. A., Atkinson B., Bell P. M., Carson D. J., McCance D. R. Reduced Prevalence of Limited Joint Mobility in Type 1 Diabetes in a U.K. 2005. *Clinic Population Over a 20-Year Period Diabetes Care* 28:658-661.
6. Diagnosis and classification of diabetes Mellitus. American Diabetes Association , 2011.
7. Marschin J.F; Murussi N; Witter V; Silveiro S.P; 2009. *Diabetes Care.* Vol 32, supplement 1
8. Kalra S. Recent advances in pathophysiology of diabetes: beyond the dirty dozen. *J Pak Med Assoc.* 2013 Feb;63(2):277-80.
9. Sinha R, Fisch G, Teague B, et al. Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. *N Engl J Med* 2002; 346: 802–10.
10. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 2001; 345: 971–80.
11. Maassen JA, ‘t Hart LM, Van Essen E, et al. Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation. *Diabetes* 2004;53 (suppl 1): S103–09.

12. Pozzilli P, Di Mario U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult): definition, characterization, and potential prevention. *Diabetes Care* 2001; 24:1460–67.
13. Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 1998; 21: 1167–72.
14. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive bloodglucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837–53.
15. World Health Organization Expert Committee. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation, part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization, 1999.
16. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346: 393–403.
17. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001; 344:1343–50.
18. Mills GW, Avery PJ, McCarthy MI, et al. Heritability estimates for beta cell function and features of the insulin resistance syndrome in UK families with an increased susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004; 47: 732–38.
19. Hattersley AT, Tooke JE. The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease. *Lancet* 1999; 353: 1789–92.
20. Basta G, Lazzerini G, Del Turco S, Ratto Gm, Schmidt Am, De Caterina R. At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cells adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(7):1401-7, 2005.
21. Basta G, Lazzerini G, Del Turco S, Ratto Gm, Schmidt Am, De Caterina R. At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular

- cells adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(7):1401-7, 2005.
22. Ahmed Ka, Muriandy S, Ismail Is. Nε-(Carboxymethyl)lysine and Coronary Atherosclerosis-Associated Low Density Lipoprotein Abnormalities in Type 2 Diabetes: Current Status. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 44, 14-27, 2009.
 23. Busch M, Franke S, Wolf G, Rohde Rd, Stein G, For The Collaborative Study Group. Serum levels of advanced glycation end products N-carboxymethyllysine and pentosidine are not influenced by treatment with the angiotensin receptor II type 1 blocker irbesartan in patients with type 2 diabetic nephropathy and hypertension. *Nephron Clin Pract.* 108:c291-c297, 2008.
 24. Calcutt Na, Cooper Me, Kern Ts, Schimdt Am. Therapies for hyperglycemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8(5):417-29, 2009.
 25. Calkin Ac, Giunti S, Sheehy Kj, Chew C, Boolell V, Rajaram Ys, Cooper Me, Jandeleit-Dahm Ka. The Hmg-CoA reductase inhibitor rosuvastatin and the angiotensin receptor antagonist candesartan attenuate atherosclerosis in an apolipoprotein E-deficient mouse model of diabetes via effects on advanced glycation, oxidative stress and inflammation. *Diabetologia.* 51:1731-40, 2008.
 26. Chang T, Wu L. Methyglyoxal, oxidative stress, and hypertension. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84:1229-1238, 2006.
 27. Chen X, Andresen1 Bt, Hill M, Zhang J, Booth F, Zhang C. Role of reactive oxygen species in tumor necrosis factor-alpha induced endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rev.* 4(4):245-255, 2008.
 28. C Arkkila PE, Koskinen PJ, Kantola IM, Rönnekaa T, Seppänen E, Viikari JS. Biochemical markers of types I and III collagen and limited joint mobility in type 1 diabetic patients. *Acta Diabetol* 2003;40(4):151-59
 29. Douloumpakas I, Pyrpasopoulou A, Triantafyllou A, Sampanis Ch, Aslanidis S. Prevalence of musculoskeletal disorders in patients with type 2 diabetes mellitus: a pilot study. *Hippokratia.* 2007 Oct-Dec; 11(4): 216–18.
 30. Wang H, Layton BE, Sastry AM. Nerve Collagens from diabetic and nondiabetic Sprague-Dawley and biobreeding rats: an anatomic force microscopy study. 2003. *Diabetes/Metabolism research and reviews*, 19: 288-98.

31. Montes GS Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 1996 Jan;20(1):15-27.
32. Chbinou, N, Frenette, J. Insulin-dependent diabetes impairs the inflammatory response and delays angiogenesis following Achilles tendon injury. 2004. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 286: R952–R957. 3
33. Atayde S.A; Yoshinari N.H; Nascimento D.P; Catanozzi S; Andrade P.C; Teodoro W.R; et al. Experimental diabetes modulates collagen remodeling of joint in rats. *Histol Histopathol* (2012) 27: 1471 – 1479.
34. Linsenmayer, TF, Collagen In: Hay, ED ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2.ed. 1991. New York, Plenum Press. p. 7-43.
35. Edwards JCW. Synovial intimal fibroblasts. 1995. *Ann Rheum Dis* 54:395-7
36. Blewis ME, Nugent-Derfus GE, Schmidt TA, Schumacher BL, Sah RL. A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *Eur Cell Mater*. 2007 Mar 6;13:26-39.
37. Carvalho A., Ordonez M. A., Garcia H., Tapia J. C., Bekavac J., Valencia J., Moreira M. Adult non-insulin dependent diabetic: Limitation articular mobility and tissue involvement. 1999. *Rev. Med. Chily*. 119(9),1016-1021.
38. Nordin & Frankel.. *Biomecânica do sistema musculoesquelético*. 2003
39. Lindsa J. R., Kenne L. A., Atkinson B., Bell P. M., Carson D. J., McCance D. R. Reduced Prevalence of Limited Joint Mobility in Type 1 Diabetes in a U.K. 2005. *Clinic Population Over a 20-Year Period Diabetes Care* 28:658-661.
40. Kameyama M, Meguro S, Funae O, Atsumi Y, Ikegami H. Jun 16 The presence of limited joint mobility is significantly associated with multiple digit involvement by stenosing flexor tenosynovitis in diabetics. *J Rheumatol*. 2009 Epub. Aug;36(8):1686-90.
41. Fujinaka, Y. , Diabetic osteoarthropathy. *Clin Calcium*. 2009 Sep;19(9):1299-303.

42. McGonagle D, Tan AL, Carey J, Benjamin M. The anatomical basis for a novel classification of osteoarthritis and allied disorders. *J Anat.* 2010 Mar;216(3):279-91. Epub 2010 Jan 7.
43. Nguyen, Q, Mort, JS, Roughley, PJ. Preferential mRNA expression of prostromelysin relative to procollagenase and in situ localization in human articular cartilage. *J. Clin. Invest.*, v. 89, p. 1189-97, 1992.
44. Linsenmayer, TF, Collagen In: Hay, ED ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2.ed. 1991. *New York, Plenum Press.* p. 7-43.
45. Prockop, DP, Kivirikko, KL, Tuderman, L, Guzman, NA, The biosynthesis of collagen and its disorders. 1979 *N. England J. Med*, v. 301, n. 1, p 12-23.
46. Alberts, B, Bray, D, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Watson, JD, *Molecular biology of the cell*. 3. Ed. *New York & London, Garland*, 1994, p. 971-84: The extracellular matrix of animals.
47. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens: structure, function and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003;55:1531-46.
48. Veit G, Kobbe B, Keene D, Paulsson M, Koch M, Wagener R. Collagen XXVIII, a novel von willebrand factor domain containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem* 2006; 281:3494-04.
49. Stefek M, Gajdosik A, Gajdosikova A, Krizanová L. Pdimethylaminobenzaldehyde- reactive substances in tail tendon collagen of streptozotocin-diabetic rats: Temporal relation to biomechanical properties and advanced glycation endproduct (AGE)- related fluorescence. 2000. *Biochim Biophys Acta*. 1502, 398-04.
50. Turk Z, Misur I, Turk N, Benko B. Rat tissue collagen modified by advanced glycation: correlation with duration of diabetes and glycemic control. 1999. *Clin. Chem. Lab. Méd.* 37(8):813-20, Aug.
51. Ren L, Fu Y, Deng Y, Qi L, Jin LJ . Advanced glycation end products inhibit the expression of collagens type I and III by human gingival fibroblasts. 2009 Jul; *J Periodontol*. 80(7):1166-73
52. Stephen T. Buckley and Carsten Ehrhardt. The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and the Lung. Artigo de Revisão. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2010 (2010).

53. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(7):949–955
54. OLMOS, Pablo et al. Fisiopatología de la retinopatía y nefropatía diabéticas. *Rev. méd. Chile* [online]. 2009
55. Mather, KJ; Mirzamohammadi, B; Lteif, A; Steinberg, HO; Baron, AD. Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 Dec;51(12):3517-23.
56. Jun JB, Kuechle M, Harlan JM, Elkon KB. Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. *Curr Op Rheumatol* 15:756-60, 2003.
57. Wigley FM. Vascular disease in scleroderma. *C Rev Allerg Immunol*. 2009; 36:150-75.
58. Lin Z, Natesan V, Shi H, Hamik A, Kawanami D, Hao C, et al. A novel role of CCN3 in regulating endothelial inflammation. *J Cell Commun Signal*. 2010;4:141-53.
59. Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9(Suppl 2):1-8.
60. Phan SH, Gharaee-Kermani M, Wolber F, Ryan US. Stimulation of rat endothelial cell transforming growth factor-beta production by bleomycin. *J Clin Invest*. 1991;87:148-54.
61. Yin Q, Nan HY, Zhang WH, Yan LF, Cui GB, Xiao F. Pulmonary microvascular endothelial cells from bleomycin induced rats promote the transformation and collagen synthesis of fibroblasts. *J Cell Physiol*. 2011; 226:2191-102.
62. Novelli M, Fabregat ME, Fernandez-Alvarez J, Gomis R, Masiello P. Metabolic and functional studies on isolated islets in a new rat model of type 2 diabetes. 2001. *Mol Cell Endocrinol*. 175: 57-66.

63. Tonra JR, Cliffer KD, Carson SR, Lindsay RM, Sue C. Bodine and Di Stefano PS. Reduced Ia-afferent-mediated Hoffman reflex in streptozotocin-induced diabetic rats. 2001. *Exp Neurol*. 172: 220-27.
64. unqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picrosirius polarization method. *Histochemistry* 1982;74:153–15.
65. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379-394.
66. Parra ER, Aguiar AC Jr, Teodoro WR, de Souza R, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clin Respir J*. 2009; 3:135-42.
67. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 107:1058-70, 2010
68. Lotz M, Martel-Pelletier J, Christiansen C, Brandi ML, Bruyère O, Chapurlat R, Collette J, Cooper C, Giacobelli G, Kanis JA, Karsdal MA, Kraus V, Lems WF, Meulenbelt I, Pelletier JP, Raynauld JP, Reiter-Niesert S, Rizzoli R, Sandell LJ, Van Spil WE, Reginster JY. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Ann Rheum Dis*. 2013
69. Attur M, Krasnokutsky-Samuels S, Samuels J, Abramson SB. Prognostic biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2013 Jan;25(1):136-44.
70. Hirohata S, Tomita T, Yoshikawa H, Kyogoku M TNF inhibitors induce discoid fibrosis in the sublining layers of the synovium with degeneration of synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2013 Apr 11. [Epub ahead of print]
71. Martin P, Teodoro WR, Velosa AP, et al. Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2012; 11(11):827-35.

72. Corradi A. The ADAM12 is upregulated in synovitis and postinflammatory fibrosis of the synovial membrane in patients with early radiographic osteoarthritis Joint Bone Spine. 2013 Apr 8. pii: S1297-319X(13)00077-8.
73. 76.Parra ER, Teodoro WR, de Morais J, *et al*. Increased mRNA expression of collagen V gene in pulmonary fibrosis of systemic sclerosis. Eur J Clin Invest 2010 ;40(2):110-20.
74. Spadari A, Romagnoli N, Predieri PG, Borghetti P, Cantoni AM, Effects of intraarticular treatment with stanozolol on synovial membrane and cartilage in an ovine model of osteoarthritis. Res Vet Sci. 2013 Jun;94(3):379-87.