Jurandir Tomaz de Miranda

**Avaliação da estrutura e síntese da matriz extracelular do tecido
cutâneo em pacientes diabéticos**

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

Programa de Ciências Médicas

**Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos**

Orientadora: Dra. Walcy P. Rosolia Teodoro

São Paulo

2021

Jurandir Tomaz de Miranda

**Avaliação da estrutura e síntese da matriz extracelular do tecido
cutâneo em pacientes diabéticos**

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

Programa de Ciências Médicas

**Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos**

Orientadora: Dra. Walcy P. Rosolia Teodoro

**(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão
original está disponível na Biblioteca da FMUSP)**

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tomaz de Miranda, Jurandir

Avaliação da estrutura e síntese da matriz
extracelular do tecido cutâneo em pacientes
diabéticos / Jurandir Tomaz de Miranda. -- São
Paulo, 2021.

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

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Imunes e Infecciosos.
Orientadora: Walcy Paganelli Rosolia Teodoro.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 2
2.Colágeno tipo VI 3.Glicolização 4.Fibrilina-1
5.Fibras elásticas

USP/FM/DBD-339/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*“Lembre de Deus em tudo o que fizer,
e Ele lhe mostrara o caminho certo”*

Provérbios 3:6

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda a transformação que Ele tem feito na minha vida, e sou muito mais feliz por estar vivendo os propósitos que Ele tem para mim.

Agradeço a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, pelo suporte financeiro da bolsa de estudo e por ser uma instituição impar no desenvolvimento das ciências médicas.

A Dra. Walcy Teodoro, pela oportunidade, orientação, confiança, compreensão, pelo desenvolvimento do trabalho, por ser uma referência para outros cientistas, meu muito obrigado por ser mais que uma orientadora, mas por muitas vezes ser uma mãe para seus alunos, somente quem trabalha e está ao seu lado poderá compreender melhor o que quero dizer.

A Dra. Ana Paula Velosa, por sua orientação e ensinamentos pelo melhor Brownie já feito.

Ao Dr. Cesar Isaac, pelo apoio e suporte científico que me engrandeceu em muito como doutorando.

A Dra. Vera, por sua ajuda e ensinamentos, que auxiliaram no meu crescimento científico.

Ao grande Dr. Jarbas Bauer seus ensinamentos e motivação que sempre disposto foi a levar seu conhecimento, independente do local e hora, muito obrigado grande professor.

As alunas do laboratório Mayra, Lais, Tais, Amanda, Zelita, Lizandre, Vitoria, Valeria, Juliana, Julia, Camila e Zambom valeu pelas dicas, pela força e pelos cafés.

Aos amigos Thiago, Ro, Michael, Pimenta, Fernandinho, Priscila, Gabriel Feijo pelas risadas e ajuda que me deram ao longo desses anos.

Meu amigo Gabriel Fonseca Alegre que me levou a USP a muitos anos atrás e me incentivou a fazer na época o mestrado, hoje não estaria aqui terminando um doutorado sem seu empurrão.

Tenho que agradecer imensamente a Verônica muito obrigado pelo seu companheirismo e pela humildade com que sempre teve comigo, pelo conhecimento passado por você, meu muitíssimo obrigado.

Agradeço ao André que me deu a oportunidade, a Julia e Fabio do Ambar, pois mesmo sem saber me ajudaram a eu me manter em São Paulo, obrigado pelo trabalho temporário, confiança e amizade.

Tenho que agradecer muito a minha esposa Nemora que sempre me apoiou e incentivou, e mesmo antes de ser minha namorada me auxiliou na ida para o congresso na Espanha e que foi compreensiva nos momentos mais difíceis. Muito obrigado e Amo você por estar ao meu lado nessa etapa da minha vida.

Rod e Rosa obrigado por toda ajuda e compreensão, vocês são demais.

A minha Mãe e meu Pai, que sem eles não estaria aqui, por todas as vivências que me fizeram passar para me tornar um homem digno e de respeito.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Produtos de glicação avançada
AT-1	Receptor de angiotensina II tipo 1
BSA	Albumina de soro de bovino
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de projeto de Pesquisa
CML	Carboximetil-lisina
Col I	Colágeno tipo I
Col III	Colágeno tipo III
Col IV	Colágeno tipo IV
Col V	Colágeno tipo V
Col VI	Colágeno tipo VI
COL1A1	Gene colágeno tipo I cadeia alfa 1
COL3A1	Gene colágeno tipo III cadeia alfa 1
COL5A1	Gene colágeno tipo V cadeia alfa 1
COL5A2	Gene colágeno tipo V cadeia alfa 2
COL6A3	Gene colágeno tipo VI cadeia alfa 3
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Derme papilar
DR	Derme reticular
ELN	Elastina
EP	Epiderme
FBN-1	Fibrilina do tipo 1
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
H&E	Hematoxilina e Eosina
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
JDE	Junção dermoepidérmica
MEC	Matriz extracelular

MMII	Membros inferiores
MMPs	Metaloproteinases
MMP-1	Metaloproteinase do tipo 1
MMP-2	Metaloproteinase do tipo 2
MMP-3	Metaloproteinase do tipo 3
MMP-7	Metaloproteinase do tipo 7
MMP-8	Metaloproteinase do tipo 8
MMP-9	Metaloproteinase do tipo 9
MMP-10	Metaloproteinase do tipo 10
MMP-12	Metaloproteinase do tipo 12
MMP-13	Metaloproteinase do tipo 13
mRNA	RNA mensageiro
OAC	Oclusão arterial crônica
PBS	Tampão fosfato sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
RAGE	Receptor de produtos finais de glicação avançada
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinase
TGFβ	Fator de crescimento transformador beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da pele humana	5
Figura 2 – Representação esquemática dos estágios da elastogênese.	7
Figura 3 - Estrutura das fibras elásticas da pele.	9
Figura 4 - Desenho esquemático representando as moléculas de colágeno	11
Figura 5 - Estruturas, montagem e secreção do colágeno tipo VI).	15
Figura 6 - Ilustração representativa do membro inferior (MMII).	18
Figura 7 - Ilustração representativa da quantificação das fibras de colágeno I.....	23
Figura 8 - Ilustração representativa da quantificação da expressão de RAGE.....	24
Figura 9 - Cortes transversais de pele de membros inferiores corados com H&E.....	28
Figura 10 – Histogramas exibindo a porcentagem de fibras elásticas.....	29
Figura 11 - Imunofluorescência em verde fluorescente de cortes transversais de pele de pacientes diabéticos da expressão do colágeno do tipo I.	31
Figura 12 - Imunofluorescência em verde fluorescente de cortes transversais de pele de pacientes diabéticos da expressão do colágeno do tipo III.....	32
Figura 13 - Imunofluorescência em verde fluorescente de cortes transversais de pele de pacientes diabéticos da expressão do colágeno do tipo V.....	33
Figura 14 - Imunofluorescência em verde fluorescente de cortes transversais de pele de pacientes diabéticos da expressão do colágeno do tipo VI	34
Figura 15 - Imunofluorescência (verde fluorescente) para RAGE.....	35
Figura 16 – Imunofluorescência em cortes transversais.....	38
Figura 17 – Imunofluorescência em cortes transversais de pele de pacientes diabéticos e não diabéticos. Notar em F aumento de colágeno VI.....	39
Figura 18 – Imunofluorescência em cortes transversais de pele de pacientes diabéticos e não diabéticos. Notar em B1 e F1 expressão tênue de elastina.....	40
Figura 19 – Imunofluorescência em cortes transversais de pele de pacientes diabéticos e não diabéticos. Notar em B1 e F1 aumento da expressão de RAGE	41
Figura 20 – Ilustração gráfica da expressão relativa dos genes.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Anticorpos anti-colágeno dos tipos I, III, V e VI e anti-RAGE.....	20
Tabela 2- Anticorpos anti-colágeno dos tipos I, III, V e VI e anti-RAGE.....	22
Tabela 3 - Relação das sequências de oligonucleotídeos estudados	26
Tabela 4 - Correlação entre expressões de proteínas usando resultados de imunofluorescência (correlação de Spearman).....	44
Tabela 5 - Correlação entre expressões de proteínas usando resultados de biologia molecular (correlação de Spearman).....	44
Tabela 6 - Comparação da correlação da expressão de proteínas entre grupos de pacientes não diabéticos e diabéticos.....	45
Anexo 1 - Características Clínicas	69

RESUMO

Tomaz de Miranda J. *Avaliação da estrutura e síntese da matriz extracelular do tecido cutâneo em pacientes diabéticos* [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

O diabetes mellitus tipo 2 (DM) é uma doença crônica de grande incidência, com alto risco de complicações macrovasculares e microvasculares que levam à incapacidade e morte prematura. É sabido que os altos níveis de glicemia afetam fortemente a homeostase da pele ao inibir a proliferação e migração de queratinócitos, biossíntese de proteínas, apoptose de células endoteliais entre outros. Ainda, o aumento da glicação não enzimática de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos leva a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) que atuam em diferentes vias prejudicando a função de proteínas intracelulares e extracelulares. Tendo em vista AGEs podem modificar a estrutura das proteínas da matriz extracelular (MEC), interferindo na sinalização célula-matriz e que o desenvolvimento de doenças de pele em diabéticos está altamente associado a um risco aumentado de desfechos importantes, como lesões de pele, ulcerações e pé diabético, nossa proposta no presente estudo foi avaliar se o receptor de AGEs (RAGE) pode alterar a distribuição dos diferentes tipos de colágeno, do sistema elástico e a interação célula-matriz, em biópsias de pele de membro inferior de diabéticos, correlacionando estes fatores com o impacto funcional do tecido cutâneo. Para o desenvolvimento deste estudo foram coletados fragmentos de pele humana íntegra, proveniente de membros inferiores amputados de pacientes diabéticos e não diabéticos. Assim sendo, os fragmentos de pele foram processados para microscopia de luz, imuno-histoquímica, imunofluorescência, análise de Imagem e qRT-PCR. Os resultados morfológicos mostram hiperplasia de queratinócitos, alongamento dos cones epiteliais, denso infiltrado de células mononucleares perto das projeções das papilas dérmicas, além de densas fibras de colágeno, associadas à atrofia dos anexos cutâneos. Ainda, o padrão de distribuição das fibras do sistema elástico apresentou-se alterado e com intensa diminuição na derme papilar e reticular ($p < 0,0001$; $p < 0,0002$), assim como o colágeno do tipo I ($p < 0,0234$; $p < 0,0299$). Por outro lado, identificamos aumento de RAGE ($p < 0,0024$) na derme reticular e intenso aumento de citoqueratina, E-caderina e principalmente de fibrilina, corroborando com o aumento da síntese do gene para FBN-1 ($p < 0,0414$) na pele dos pacientes diabéticos. Identificamos aumento significativo na expressão relativa dos genes COL1A1 ($p < 0,0070$), COL5A1 ($p < 0,0190$), COL5A2 ($p < 0,0242$), COL6A3 ($p < 0,0028$), e correlação positiva entre a expressão dos genes para COL5A1/COL1A1, COL5A2/COL1A1, COL6A3/ COL1A1, COL6A/COL5A2, COL6A3/COL5A1 nos diabéticos. Acreditamos que a compreensão dessas interações entre as proteínas da MEC, pode delinear um perfil matricelular, que poderia indicar fragilidade tecidual e, conseqüentemente, a dificuldade de reparo da pele nesses pacientes, além de trazer um novo entendimento para novas abordagens terapêuticas.

Descritores: Diabetes mellitus tipo 2; Colágeno tipo VI; Glicosilação; Fibrilina-1; Fibras elásticas.

ABSTRACT

Tomaz de Miranda J. *Evaluation of the structure and synthesis of the extracellular matrix of the skin tissue in diabetic patients* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Type 2 diabetes mellitus (DM) is a chronic disease of high incidence, with a high risk of macrovascular and microvascular complications that lead to disability and premature death. It is known that high blood glucose levels strongly affect skin homeostasis by inhibiting keratinocyte proliferation and migration, protein biosynthesis, endothelial cell apoptosis, among others. Furthermore, the increase in non-enzymatic glycation of proteins, lipids and nucleic acids leads to the formation of advanced glycation end products (AGE) that act in different pathways, impairing the function of intracellular and extracellular proteins. Considering that advanced glycation end products (AGEs) can modify the structure of extracellular matrix (ECM) proteins, interfering with cell-matrix signaling and that the development of skin diseases in diabetics is highly associated with an increased risk of important outcomes such as skin lesions, ulcerations and diabetic foot, our proposal in the present study was to assess whether the AGE receptor (RAGE) can alter the distribution of different types of collagen, the elastic system and the cell-matrix interaction in biopsies of the lower limb skin of diabetic patients, correlating these factors with the functional impact of the cutaneous tissue. For the development of this study, fragments of whole human skin were collected from amputated lower limbs of diabetic and non-diabetic patients. Therefore, the skin fragments were processed for light microscopy, immunohistochemistry, immunofluorescence, image analysis and qRT-PCR. The morphological results show hyperplasia of keratinocytes, elongation of the epithelial cones, dense infiltrate of mononuclear cells near the projections of the dermal papillae, in addition to dense collagen fibers, associated with atrophy of the cutaneous appendages. Furthermore, the distribution pattern of fibers in the elastic system was altered and showed an intense decrease in the papillary and reticular dermis ($p < 0.0001$; $p < 0.0002$), as well as type I collagen ($p < 0.0234$; $p < 0.0299$). On the other hand, we identified an increase in RAGE ($p < 0.0024$) in the reticular dermis and an intense increase of cytokeratin, E-cadherin and mainly fibrillin, corroborating the increase in gene synthesis for FBN-1 ($p < 0.0414$) on the skin of diabetic patients. We identified a significant increase in the relative expression of genes COL1A1 ($p < 0.0070$), COL5A1 ($p < 0.0190$), COL5A2 ($p < 0.0242$), COL6A3 ($p < 0.0028$), and positive correlation between expression of the genes for COL5A1/COL1A1, COL5A2/COL1A1, COL6A3/ COL1A1, COL6A3/ COL5A2, COL6A3/COL5A1 in diabetics. We believe that understanding these interactions between ECM proteins can delineate a matricellular profile, which could indicate tissue fragility and, consequently, the difficulty of skin repair in these patients, in addition to bringing new understanding to new therapeutic approaches.

Descriptors: Diabetes mellitus type 2; Type VI collagen; Glycosylation; Fibrillin-1; Elastic fibers.

.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
DIABETES	1
<i>Considerações gerais</i>	<i>1</i>
PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs)	2
COMPROMETIMENTO CUTÂNEO NO DIABETES	4
MATRIZ EXTRACELULAR NA PELE DE DIABÉTICA	6
<i>Fibras elásticas</i>	<i>6</i>
<i>Colágeno</i>	<i>10</i>
OBJETIVO	16
MÉTODOS	17
CASUÍSTICA	17
CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	17
COLETA DAS AMOSTRAS	17
ANÁLISE MORFOLÓGICA DA PELE	18
<i>Avaliação anatomopatológica da pele dos pacientes diabéticos</i>	<i>18</i>
<i>Imunofluorescência do colágeno dos tipos I, III, V, VI e RAGE</i>	<i>19</i>
<i>Dupla Imunomarcção para o Colágeno dos tipos I, IV, VI, actina, citoqueratina, E-caderina, elastina, fibrilina, vimentina e RAGE</i>	<i>20</i>
QUANTIFICAÇÃO DOS COLÁGENOS E RAGE NA PELE DE PACIENTES NÃO DIABÉTICOS E DIABÉTICOS	22
<i>Histomorfometria do colágeno dos tipos I, III, V e VI e RAGE</i>	<i>22</i>
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES COL1A1, COL3A1, COL5A1, COL5A2, COL6A3, TGFB1, MMP-1, MMP-2, AT-1 E FBN-1 NA PELE PACIENTES DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS	24
<i>Extração de mRNA de amostras de pele de pacientes diabéticos e não diabéticos</i>	<i>24</i>
<i>Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA por espectrofotometria</i>	<i>25</i>
<i>Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real (qRT-PCR)</i>	<i>25</i>
ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
RESULTADOS	27
ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO TECIDO CUTÂNEO DE PACIENTES DIABÉTICOS	27
AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DAS FIBRAS ELÁSTICAS DO TECIDO CUTÂNEO	29
ANÁLISE DE IMUNOMARCADORES DÉRMICOS DE COLÁGENO E DE ANEXOS	29
MARCADORES EPITELIAIS E MESENQUIMAIS NA PELE	35
ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO COL1A1, COL3A1, COL5A1, COL5A2, COL6A3, TGFB1, MMP-1, MMP-2, AT-1 E FBN-1 NO TECIDO CUTÂNEO	41
ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE GRUPOS DE PACIENTES NÃO DIABÉTICOS E DIABÉTICOS ..	43
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO	69
CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES	69

INTRODUÇÃO

Diabetes

Considerações gerais

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica heterogênea, caracterizada pela presença de hiperglicemia associada com alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e gordura, devido ao comprometimento da secreção de insulina, pela ação defeituosa da insulina ou ambos (Centers for Disease Control and Prevention, 2017; Diabetes, 2013). A maioria dos casos de DM pode ser amplamente classificada em duas categorias: diabetes tipo 1 (DM1) e diabetes tipo 2 (DM2). No caso da DM1, a deficiência absoluta da insulina está associada com a destruição autoimune das células β pancreáticas, resultando em cetoacidose e estresse oxidativo. 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 casos (Care and Suppl, 2019; Diabetes, 2013; Maraschin et al., 2010). Por outro lado, o DM2 é mais comum, abrangendo de 90 a 95% do total de casos. No DM2 ocorre um distúrbio heterogêneo, caracterizado pela resistência à insulina, com vários graus de defeitos na secreção de insulina, seguido por secreção reduzida de insulina pelo pâncreas, ou seja, é uma consequência da disfunção das células β pancreáticas (Dilworth et al., 2021). No processo de resistência à insulina, este hormônio secretado pelas ilhotas pancreáticas que não é capaz de promover a captação da glicose pelas células, resultando em altos níveis de glicose e compensatória concentração de insulina circulante no sangue. Na maioria dos casos os pacientes possuem sobrepeso, sedentarismo e cetoacidose ocorrendo apenas em situações especiais, como infecções graves (Care and Suppl, 2019; Centers for Disease Control and Prevention, 2017; Diabetes, 2013; Maraschin et al., 2010).

A prevalência no número de adultos com DM aumenta a uma taxa maior em países de baixa e média renda do que em países de alta renda. Este aumento na prevalência foi agravada por uma população crescente e envelhecida, quase quadruplicando o número de adultos com diabetes de 1980 a 2014 em todo o mundo (The Lancet 2017). De acordo com a última edição do *International Diabetes Federation*, existem cerca de 460 milhões de adultos com idade entre 20-79 anos com DM em todo o mundo (Guillon et al., 2021).

Existe uma estimativa que em 2045 este número possa aumentar para 700 milhões. Segundo (Boyle et al., 2010) que fizeram uma projeção para os próximos anos

sobre a prevalência do DM entre diagnosticada e não diagnosticada nos Estados Unidos, estimando a proporção de 1 em 5 e 1 em cada 3 adultos em 2050.

A proporção de pessoas com DM2 está aumentando em muitos países, sendo uma das 10 principais causas de morte, com cerca de metade dos casos de pessoas com menos de 60 anos. Ainda, o DM foi responsável por cerca de US\$ 760 bilhões em gastos com saúde em 2019 (Guillon et al., 2021).

Neste cenário mundial, as pesquisas têm se intensificado para garantir maior sobrevida frente às graves complicações que acometem os órgãos vitais destes indivíduos. Porém, apesar da terapêutica medicamentosa ter evoluído significativamente frente à expectativa de vida dos pacientes, a qualidade de vida continua sendo problemática, principalmente devido aos fatores limitantes, sintomas álgicos e parestésicos presentes em fases descompensadas e tardias do DM2 (Diabetes, 2013). Já está bem estabelecida, que as neuropatias periféricas, a nefropatia, a retinopatia diabética e as alterações microvasculares, gastrointestinais, cardíacas e cutâneas são as principais complicações encontradas nos pacientes com DM2 (Brennan, 1989; Chbinou and Frenette, 2004; Le Pape et al., 1981; Wang et al., 2003). Os problemas relacionados à cicatrização cutânea são uma das mais graves complicações relacionadas ao DM, os quais normalmente resultam em úlceras crônicas que levam a amputação de membros inferiores. Aproximadamente um milhão de pacientes com DM são submetidos a amputações de dedos ou pés todos os anos (Guillon et al., 2021; Mishra et al., 2017).

Em resumo, sabendo que a taxa glicêmica descompensada por um longo espaço de tempo, gerando um acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que altera o metabolismo de indivíduos com DM, resultando em mudanças na estrutura das proteínas da matriz cutânea, comprometendo a função celular e a cicatrização, justifica a abordagem do presente estudo em delinear um perfil das proteínas da matriz cutânea, sob a ação do receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) e relacionar com as alterações epiteliais no DM.

Produtos finais de glicação avançada (AGEs)

Os AGEs são um dos fatores chave envolvidos nas complicações relacionadas à hiperglicemia no DM. Os AGEs são um grupo heterogêneo de moléculas caracterizadas pela formação de pontes covalentes irreversíveis entre um açúcar reduzido e um grupo amina presente em proteínas, lipídios e ácido nucleicos. São derivados principalmente das reações denominadas de Maillard, as quais consistem na sacarificação ou glicação não-enzimática das proteínas, lipídios e ácidos nucléicos. A reação inicial entre a

glicose e os grupos amina forma um produto intermediário instável, uma base de Schiff, a qual sofre, um rearranjo interno, para formar uma proteína glicada estável, também conhecida como um produto da glicação precoce ou produto de Amadori. Os produtos da glicação precoce podem sofrer uma série de reações químicas e rearranjos, levando à formação de AGEs, que são conectados de forma covalente e irreversível por ligações cruzadas derivadas da glicose, e baseadas em imidazol e pirrol (Ahmed et al., 2009; Basta et al., 2005; Busch et al., 2008; Yang et al., 2019). Um dos principais e mais estudado AGE é a carboximetil-lisina (CML) (Delgado-Andrade, 2016).

Os AGE interagem com seu receptor celular (RAGE) para produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da ativação da NADPH oxidase, iniciando assim o estresse oxidativo intracelular. Por outro lado, o aumento na produção de ROS pode, por sua vez, promover a produção de AGEs, formando assim um círculo vicioso entre o estresse oxidativo e os AGEs (Faria and Persaud, 2017). Ainda, o aumento de AGEs, juntamente com alterações estruturais nos tecidos, levando ao desenvolvimento das complicações no DM (Ahmed et al., 2009). Os AGEs acumulam-se em pequenos e grandes vasos e são um dos fatores que contribuem para as complicações microvasculares nos pacientes com DM2. As ligações covalentes nos AGEs podem modificar bioquimicamente a estrutura e as funções de muitas proteínas, incluindo os componentes dos dois principais tipos de matriz extracelular (MEC), que são a matriz intersticial e da membrana basal. Entre os componentes da MEC, as proteínas fibrosas como o colágeno e elastina, além da fibronectina e laminina são os alvos potenciais de glicação, devido ao seu baixo *turnover* e longa permanência nos tecidos (Rojas et al., 2018). O impacto da glicação na funcionalidade da MEC concentra-se em dois mecanismos principais: em primeiro lugar, pela modificação do reconhecimento molecular em locais específicos de ligação das proteínas e, em segundo lugar, pela alteração das propriedades mecânicas devido às ligações cruzadas de proteínas estruturais, como o colágeno, levando ao enrijecimento dos tecidos (Busch et al., 2008; Rojas et al., 2018). Além disso, as proteínas modificadas por AGE são reconhecidas por RAGE. A ligação entre os AGEs e seus receptores gera uma cascata de sinalização intracelular, associada a um gatilho pró-inflamatório, que desencadeia fortes e resistentes respostas celulares (Rojas et al., 2018). Esta resposta inflamatória exacerbada, aliada às alterações vasculares envolvidas nos pacientes com DM2, pode resultar no comprometimento da cicatrização cutânea, por restringir o transporte de nutrientes, induzir queda na capacidade elástica do vaso, com consequente

vasodilatação limitada e isquemia funcional, diminuição da hiperemia máxima e prejuízo da autorregulação dos capilares (R. Gary Sibbald and Woo, 2008).

Comprometimento cutâneo no diabetes

Entre uma série de complicações relacionadas à hiperglicemia, as patologias envolvendo o tecido cutâneo são registradas em cerca de 30 a 70% dos pacientes com DM (Meurer et al., 2004). A severidade das doenças envolvendo a pele pode variar de benignas às mais severas, com risco de vida. As alterações cutâneas diabéticas podem ser um sinal inicial do descontrole glicêmico em pacientes ainda não diagnosticados.

Estas alterações comprometem a estrutura morfológica da pele, que em condições normais é composta por duas camadas: a camada externa epidérmica e a camada dérmica interna. A epiderme (EP) apresenta dois tipos celulares: as células escamosas, que são as mais superficiais e as células basais, que produzem o pigmento de coloração da pele, a melanina. A EP funciona como uma barreira protetora composta pelos queratinócitos, que são células produtoras de queratina e possui aproximadamente 0,04mm a 1,6mm de espessura. Por outro lado, a derme é mais profunda, e é composta principalmente de fibras elásticas e colágenas, que estão dispostos em tramas perpendiculares à superfície, além de outros elementos da MEC, como elastina, glicosaminoglicanos, íons e água (Marcos-Garcés et al., 2014; Pérez-Sánchez et al., 2018).

A derme apresenta duas subcamadas: derme papilar (DP) que fica em contato com EP, formada por tecido conjuntivo frouxo, e a derme reticular (DR), constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam as fibras de colágeno as quais concedem força e elasticidade à pele (Figura 1). Na derme também se localizam os vasos sanguíneos que a nutrem, vasos linfáticos, nervos, estruturas anexas, tais como os pelos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas. Em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme, que embora tenha a mesma origem da derme, não faz parte da pele, apenas serve de suporte e união com os órgãos subjacentes (Marcos-Garcés et al., 2014; Michalak et al., 2021).

O principal tipo de célula residente na derme é o fibroblasto, responsável pela produção dos componentes da MEC, importantes na estrutura e função do tecido. Entre os componentes da MEC da derme, destacam-se as fibras elásticas e o colágeno, que engloba uma família de glicoproteínas, essenciais para o suporte estrutural da pele e, também, está envolvido na adesão, migração e proliferação celular.

Figura 1 – Representação esquemática da pele humana, mostrando as camadas cutâneas e as principais proteínas estruturais (colágeno e elastina). Figura adaptada e modificada de (Jo et al., 2021).

Entre as alterações cutâneas relacionadas ao DM, a cicatrização de feridas constitui um dos grandes problemas enfrentados pelos pacientes com DM. O processo normal de cicatrização envolve algumas fases: a inflamatória, a proliferativa e, por último, a fase de remodelação do tecido. Na fase inflamatória, inicialmente ocorre aumento do influxo de células como neutrófilos, seguidos por macrófagos, que liberam uma série de citocinas, fatores de crescimento e metaloproteinases de matriz (MMPs), essenciais para a remoção do tecido desvitalizado. A fase proliferativa envolve a proliferação e migração de fibroblastos das áreas não lesionadas para a região da ferida. Nesta etapa, os fibroblastos secretam principalmente colágeno tipo III (Col III), formando o tecido de granulação. Além disso, os fibroblastos podem se diferenciar em miofibroblastos, que têm a capacidade contrátil para alcançar as bordas da ferida. Neste mesmo período, a neoangiogênese resulta na vascularização da derme e a proliferação de queratinócitos favorece a reepitelização e fechamento da EP (Baltzis et al., 2014; Guillon et al., 2021; Kellar et al., 2020). Na fase de remodelamento, as MMPs também participam no remodelamento da MEC, que consiste na substituição do tecido cicatricial por uma matriz fisiológica. Durante essa fase, os fibroblastos produzem principalmente colágeno tipo I (Col I), para restaurar uma matriz que se assemelha ao tecido não lesado (Grzela et al., 2016; Guillon et al., 2021; Lobmann et al., 2002; Tardáguila-García et al., 2019).

Já nos pacientes com DM, a hiperglicemia e a glicação das proteínas da MEC, estimulam a síntese excessiva de MMPs pelos fibroblastos, comprometendo a cicatrização cutânea (Wall et al., 2003). As feridas diabéticas são uma das principais preocupações, que incluem úlcera de membros inferiores/úlcera diabética. O DM atrasa

o processo de cicatrização porque prejudica cada fase da cicatrização das feridas, ou seja, hemostasia, inflamação, proliferação e fase de remodelação, o que tem um efeito negativo de longo prazo na qualidade de vida, morbidade e mortalidade. As feridas diabéticas são caracterizadas por serem crônicas, revelando uma cicatrização anormal resultante de um processo adiado, incompleto ou descoordenado (Patel et al., 2019). As feridas diabéticas exibem uma fase inflamatória persistente associada a um impedimento na formação de tecido de granulação madura e redução na resistência à tração da ferida (Jiang and Scharffetter-Kochanek, 2020).

(Argyropoulos et al., 2016) encontraram aumento da MMP-1, MMP-2 e gelatinase-A, principal protease que digere colágeno, produzidas na região dérmica da pele de pacientes com DM. Além disso, neste mesmo estudo, os autores não encontraram diferença na síntese de mRNA para os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), os TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ou TIMP-4 na pele de diabéticos, sugerindo um desbalanço entre a produção das MMPs e TIMPs.

Matriz extracelular na pele de diabética

Fibras elásticas

O sistema elástico abrange fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas e sob o aspecto ultraestrutural, as fibras elásticas são compostas por um centro constituído de elastina circundada por microfibrilas constituídas principalmente por fibrilina. Estas microfibrilas são as primeiras a aparecer, sendo a maturação da fibra elástica realizada através do depósito de elastina. A elastina é uma proteína essencial para proporcionar extensibilidade e resiliência para as fibras elásticas e consequentemente para os órgãos. Apresenta meia-vida de cerca de 70 anos e pode se alongar, reversivelmente, em oito vezes seu comprimento de repouso. As propriedades mecânicas da elastina regulam a celularidade, influenciando de forma positiva o crescimento celular (Aamodt and Grainger, 2016; Rodríguez Cabello et al., 2018; Yeo et al., 2018). Além disso, o alinhamento das fibras elásticas tem efeito sobre o fenótipo, adesão e proliferação celular. Esses efeitos biológicos podem ser explicados por interações entre fragmentos de elastina e o receptor de elastina/laminina, além da ligação com integrinas, as quais contribui para a síntese de elastina, quimiotaxia de fibroblastos e proliferação de queratinócitos (Daamen et al., 2007; Miranda-Nieves and Chaikof, 2017; Rodgers and Weiss, 2005).

A elastina é codificada pelo gene ELN, sintetizado por várias células, incluindo fibroblastos, células musculares lisas e endoteliais, como uma proteína precursora

solúvel, denominada tropoelastina de ~60-70 kDa. Na pele, os fibroblastos são o principal produtor de tropoelastina, que apresenta domínios predominantemente hidrofóbicos e hidrofílicos alternados. Depois que a tropoelastina é sintetizada, se agrega na superfície da célula na forma de microfibrilas, com posterior formação de ligações cruzadas, iniciadas pela oxidação realizada por membros da família da lisil oxidase, Figura 2 (Uitto et al., 2013; Wen et al., 2020). Nas fibras elásticas maduras, o núcleo de elastina compreende mais de 90% do volume, enquanto as microfibrilas de fibrilina são em grande parte confinadas a um manto externo (Sherratt, 2009).

Figura 2 – Representação esquemática dos estágios da elastogênese. As microfibrilas de fibrilina e outras proteínas associadas são secretadas e conduzidas por proteoglicanos, multimerizadas e montadas em um molde microfibrilar em formato de colar de contas. Os monômeros de tropoelastina são sintetizados no retículo endoplasmático rugoso (RER), onde se associam com proteínas de ligação, e são transportados através do aparelho de Golgi e secretados na membrana plasmática. A dissociação subsequente da proteína ligadora de tropoelastina é induzida pela ligação das glicosaminoglicanas. As moléculas de tropoelastina liberadas se agregam na superfície da célula. A desaminação oxidativa dos resíduos de Lisil oxidase induzem uma sequência de reações de condensação dando origem a reticulações intra e intermoleculares. Os aglomerados prematuros de elastina crescem por meio da adição de moléculas de tropoelastina e se destacam da superfície celular à medida que atingem um tamanho crítico, completando a maturação da fibra elástica. Figura adaptada e modificada de SCHMELZER e DUCA, 2021.

Em humanos e na maioria dos outros mamíferos, as fibrilinas são codificadas por três genes ativos *FBN1*, *FBN2* e *FBN3*. A fibrilina-1 é expressa ao longo da vida, enquanto as fibrilinas 2 e 3 estão presentes, principalmente, durante o desenvolvimento fetal e embrionário. As microfibrilas de fibrilina, que têm a aparência de gotas em um

cordão, são o principal componente das fibras elásticas, conferindo extensibilidade de longo alcance e contribuindo para a deformação elástica dos tecidos. As microfibrilas também desempenham um papel fundamental na homeostase do tecido por meio de sua interação com fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador- β (TGF β) e proteínas morfogenéticas ósseas e por meio da interação com receptores de superfície celular, como as integrinas e sindecanos (Bax et al., 2003; Jovanovic et al., 2007).

A fibrilina-1 é sintetizada como um precursor profibrilina, o qual sofre a ação proteolítica da endoprotease furina nos domínios N- e C-terminais (Corson et al., 2004; Lönnqvist et al., 1998; Milewicz et al., 1995; Reinhardt et al., 1996; Zhang et al., 1995). Estas clivagens fazem parte da maturação da fibrilina-1, que levam ao desenvolvimento de formas maduras com cerca de 320 kDa, e além disso, são essenciais para subsequente deposição linear, numa estrutura em forma de gotas, montada na membrana celular (Figura 2). Foi demonstrado experimentalmente que durante a formação da fibrilina o domínio N-terminal dos grânulos se liga na membrana da célula a proteoglicanos, que contenham heparina e sulfato de heparina (Schmelzer and Duca, 2021). Na sequência, os monômeros de fibrilina interagem, através dos seus domínios terminais, formando microfibrilas em forma de “cordão de gotas”, as quais são transportadas e estabilizadas por uma rede de fibrilina (Schmelzer and Duca, 2021). Ainda, a estabilidade da estrutura molecular tridimensional da fibrilina é realizada por ligações dissulfeto intermoleculares, mediadas por transglutaminases (Figura 2).

Uma das principais funções das microfibrilas contendo fibrilina é a sua contribuição essencial para fornecer uma estrutura para a deposição linear adequada da tropoelastina, no andaime de microfibrilas. A associação entre as microfibrilas de fibrilina com os agregados de elastina dão origem às fibras elásticas funcionais. Entretanto, as fibras elásticas não estão distribuídas de forma homogênea no corpo humano, elas se apresentam em proporções quantitativas e qualitativas diferentes em órgãos distintos como a pele, cartilagem, tendões, pulmões e nervos (Cotta Pereira et al., 1976; Sherratt, 2009).

O processo de envelhecimento tem um efeito profundo na estrutura e função desse sistema de fibras elásticas. Como exemplo pode ser citado as alterações relacionadas com a idade nas propriedades mecânicas do sistema vascular, que têm efeitos profundos na mobilidade e mortalidade humanas. Ainda, mutações nos componentes das fibras elásticas, a fibrilina e da tropoelastina, que têm um papel fundamental na manutenção da função arterial, causam consequências clínicas graves

(Kielty et al., 2002; Sherratt, 2009). Mutações na fibrilina-1, o principal componente estrutural das microfibrilas, causam a síndrome de Marfan, uma doença hereditária com graves defeitos aórticos, oculares e esqueléticos (Ashworth et al., 1999; Kielty et al., 2005), além de outras, como a síndrome de Weill Marchesani e síndrome de Shprintzen-Goldberg (Faivre et al., 2003). Mutações na elastina podem, igualmente, ter um impacto grave, dando origem à estenose aórtica supralvar, que por sua vez pode causar hipertrofia ventricular esquerda e em última instância, insuficiência cardíaca congestiva (Milewicz et al., 2000).

Em geral, os tecidos ricos em fibras elásticas, como a pele, perdem sua conformidade com o envelhecimento (Sherratt, 2009). Na pele normal, o sistema de fibras elásticas é altamente ordenado, no entanto na DR, as fibras elásticas de maior diâmetro ficam paralelas à superfície da pele. Estas fibras estão conectadas às fibras elásticas, de menor diâmetro, na DP e eventualmente, às fibras oxitalânicas que se ligam à DP e ao epitélio, via junção dermoepidérmica (JDE) (Figura 3) (Sherratt, 2009).

Figura 3 - Estrutura das fibras elásticas da pele. O sistema de fibras elásticas na pele está limitado à derme, onde as fibras elásticas compostas de elastina e fibrilina na derme reticular, dão lugar a arranjos de feixes de microfibrilas de fibrilina na junção dermoepidérmica (JDE). As microfibrilas de fibrilina do sistema elástico são sintetizadas por queratinócitos e fibroblastos dérmicos. Figura adaptada e modificada de (Sherratt, 2009).

Ao longo do tempo, a pele humana acumula danos, devido à ação de processos metabólicos normais e interações com fatores ambientais (Sherratt, 2009). O

envelhecimento do tecido elástico normal está geralmente associado a uma perda progressiva de elasticidade, resultando em enrugamento da pele. Essas mudanças mecânicas que refletem na degeneração estrutural, incluindo desnudação do manto microfibrilar em torno das fibras elásticas e exposição do núcleo de elastina à degradação proteolítica. Já a pele foto danificada apresenta elastólise, que consiste no aparecimento de grandes quantidades de elastina desordenada, além da perda da integridade da rede microfibrilar na JDE (Watson et al., 1999). Essa perda de integridade da rede de fibras elásticas, considerando as microfibrilares oxitalânicas da DP, as fibras elaunínicas, associadas a pequenas quantidades de elastina na DR, e as fibras elásticas espessas da DR, leva à perda de elasticidade da pele (Kielty et al., 2005).

Por outro lado, em situações de alta taxa de glicêmica, como em pacientes com DM, a glicação da elastina também leva à redução da elasticidade da pele ou ao afrouxamento da pele. Em ensaios *in vitro*, usando um modelo de glicação de proteínas, os AGEs produzidos a partir da elastina mostraram uma quantidade menor da CML e quantidades comparáveis de intermediários de AGE, como 3-desoxiglucoseona, glioxal e metilglioxal, comparado com outras proteínas, como albumina, queratina e proteoglicanos (Yonei et al., 2015). Em suma, a elasticidade da pele diminuiu com o aumento da idade, e essa tendência é mais proeminente em pacientes com DM e maior estresse oxidativo, o qual aumenta as reações de glicação.

Colágeno

O colágeno é a família de proteínas mais abundante do organismo, representando cerca de 30% do seu peso seco. Eles se distinguem entre si pela composição molecular, características morfológicas, distribuição e funções. A família do colágeno é composta por mais de trinta e dois tipos geneticamente diferentes, sendo que os mais frequentes na derme são os colágenos do tipo (Col) I, II, III, IV, V, VI, VII (Sorushanova et al., 2019)

Os colágenos mais abundantes na pele são os tipos I e III, com cerca de 90% e 15%, respectivamente. O Col I faz parte do grupo dos colágenos fibrilares e exerce um importante papel como substrato adesivo para muitas células, além de participar do desenvolvimento de órgãos e tecidos através dos processos de migração, proliferação e diferenciação celular, na cicatrização e remodelamento tecidual. O Col I é uma proteína insolúvel e o principal componente fibroso da derme humana (Jansen et al., 2018; Meyer, 2019; Ricard-Blum, 2011). As fibras de Col I estão presentes na DP e DR e são

responsáveis pela resistência do tecido às forças de tensão (Figura 4) (Sorushanova et al., 2019).

Figura 4 - Desenho esquemático representando as moléculas de colágeno (tropocolágeno) que se agregam para formar fibrilas, fibras e feixes. Cada uma das unidades de tropocolágeno mede 280 nm de comprimento e se sobrepõem umas às outras (A). Este arranjo resulta em regiões de sobreposição e regiões lacunares (B) que resultam na estriação transversal, característica da fibrila de colágeno com faixas claras e escuras que se alternam a cada 64nm, como observado ao microscópio eletrônico (C). Os agregados de fibrilas formam as fibras (D) que tornam a se agregar para formar os feixes (E) rotineiramente denominados de fibras de colágeno. Figura representativa e modificada de (JUNQUEIRA and CARNEIRO, 2013)

O Col III também é fibrilar e encontra-se na derme, formando fibras reticulares pequenas com cerca de 20nm de diâmetro, importantes na sustentação do tecido (D'hondt et al., 2018; Keene et al., 1987). O Col III é produzido em maior quantidade no tecido de granulação na fase inicial de cicatrização, normalmente sendo substituído pelo Col I nas fases finais de cicatrização (Karsdal et al., 2017; Tracy et al., 2016). Este colágeno na derme se encontra em contato com estruturas como vasos sanguíneos e glândulas. O Col III não é visível à coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E). Devido ao seu diâmetro reduzido e à sua disposição frouxa, essas fibras criam uma rede flexível em órgãos que são sujeitos a mudanças fisiológicas de forma e volume (Sorushanova et al., 2019).

Entre os colágenos de menor proporção na pele, destaca-se o Col V, do grupo dos colágenos fibrilares, que representa de 2 a 5% do total de fibras. Apresenta-se na pele em duas isoformas moleculares diferentes: a heterotrímera com duas cadeias $\alpha 1(V)$ e uma $\alpha 2(V)$ [$\alpha 1(V)_2 \alpha 2(V)$], que participa tanto na organização, quanto na estabilidade da matriz extracelular e a homotrímera, com três cadeias $\alpha 1(V)$ [$\alpha 1(V)_3$], que atua como

ponte molecular na estabilização da interface dermoepidérmica (Mak et al., 2016; Ruggiero et al., 1996). As isoformas $\alpha 1(V)$ $\alpha 2(V)$ do Col V se copolimeriza com o Col I e Col III, para formar as fibrilas heterotrímeras, que são o arcabouço fibrilar da pele. A porção tripla hélice helicoidal do Col V encontra-se oculta no interior destas fibrilas e o domínio globular amino terminal (-NH₃) é projetado para a superfície (Birk et al., 1990; Linsenmayer et al., 1993). Este domínio globular regula o crescimento fibrilar, impedindo fisicamente que novos monômeros se acrescentem à fibrila. Devido a esta característica o Col V tem função importante na organização, crescimento e dimensionamento do diâmetro das fibrilas heterotípicas, sendo atualmente considerado o moderador da fibrilogênese do Col I (Gelse et al., 2003; Ricard-Blum, 2011). O Col V também é importante para a adesão, migração e proliferação celular. Estas propriedades estão em grande parte relacionadas às sequências de arginina glicina e ácido aspártico, presentes nas cadeias α do Col V (Ruggiero et al., 1994). A adesão do Col V às células é mediada, principalmente, pelas integrinas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$, que são receptores presentes nas membranas das células (Ruggiero et al., 1996, 1994). A adesão do Col V às células pode, também, ocorrer através de um domínio extremamente básico na cadeia $\alpha 1(V)$, com grande afinidade a heparina e sulfato de heparina, ligados na superfície celular (Delacoux et al., 1998; Ricard-Blum et al., 2006).

Embora resistentes à digestão por collagenases intersticiais, o Col V nativo e desnaturado é degradado por metaloproteinases e gelatinases, promovendo assim o remodelamento da MEC. O Col V interage com outros colágenos da matriz e proteínas estruturais, conferindo integridade estrutural ao tecido. Este se liga às macromoléculas da matriz, modulando o comportamento celular e suas funções. O Col V monitora as fibrilas heterotípicas do Col I na derme, atuando como um regulador dominante da fibrilogênese do colágeno (Mak et al., 2016).

Outro tipo de colágeno também presente na pele, em menor quantidade, é o Col VI, um dos componentes da membrana basal, que juntamente com a laminina, proteoglicanos e heparan sulfato, contribui para a força e elasticidade, adesão celular e controle da passagem de substâncias através da membrana basal. O Col VI é codificado por seis genes diferentes (*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*, *COL6A4*, *COL6A5* e *COL6A6*), mas a isoforma mais comum é a formada pelas cadeias $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ e $\alpha 3(VI)$. Este colágeno possui uma organização supramolecular complexa, formada por uma rede entrelaçada de microfilamentos na MEC (Figura 5) (Cescon et al., 2015). O Col VI exerce diferentes papéis nos tecidos onde é expresso, variando desde a função mecânica a funções citoprotetivas mais específicas, incluindo inibição da apoptose e dano

oxidativo, a promoção de crescimento e progressão tumoral, regulação da diferenciação celular e maquinaria autofágica e manutenção da rigidez celular (Cescon et al., 2015). Embora esteja ausente na EP, o Col VI é abundantemente expresso pelos fibroblastos da pele e apresenta ampla distribuição na derme, incluindo sua associação à vasculatura, fibras nervosas, folículos capilares e hipoderme, além disso, é particularmente abundante na membrana basal na JDE (Gara et al., 2011). Por outro lado, à ampla distribuição da isoforma $\alpha 1$ (VI), $\alpha 2$ (VI) e $\alpha 3$ (VI) na pele, a cadeia $\alpha 5$ (VI) é encontrada na DP, enquanto a $\alpha 6$ (VI) é encontrada ao redor dos vasos (Sabatelli et al., 2011). Na pele, o Col VI é um regulador essencial na organização e composição da matriz dérmica, no comportamento dos fibroblastos e pode desempenhar um papel importante na cicatrização de feridas e regeneração de tecidos (Theocharidis et al., 2016). O Col VI também serve como aporte para ancorar as fibras elásticas dentro dos tecidos por meio de interações com outros componentes da MEC, como o Col VI (Finnis and Gibson, 1997). Alterações na expressão do Col VI são associadas com algumas anormalidades na pele, como queloides, cicatrizes, pele seca, estrias vermelhas e queratose folicular, e ainda, foi demonstrado seu envolvimento no crescimento e maturação capilar (Chen et al., 2015).

Na pele dos pacientes com DM, a função dos fibroblastos e do colágeno são afetadas diretamente pelo intenso acúmulo dos AGEs na derme. O colágeno glicosilado, produzido pelas reações não enzimáticas, aumenta com o tempo de duração da doença. Ainda, no DM frequentemente ocorre alterações na síntese e organização do colágeno, comprometendo completamente a integridade estrutural e as propriedades mecânicas da pele. Muitas vezes, o acúmulo de colágeno degradado na pele de pacientes com DM resulta no aumento de endoproteases, dependentes de zinco, denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs), fazendo com que a pele de DM pareça semelhante a uma pele envelhecida (Suh et al., 2018).

Estudos anteriores de (Lobmann et al., 2002), mostraram que a pele de pacientes com DM tem uma deficiência no metabolismo do colágeno, apresentando diminuição das fibras de Col I, resultando em remodelamento e degradação da matriz cutânea pelo aumento das MMPs. Já em trabalhos experimentais, foi observada uma significativa redução de Col I e Col III na pele dos ratos com DM induzido por estreptozotocina (Suh et al., 2018). Estes autores mostraram que o controle precoce da glicemia foi um fator benéfico para a recuperação do colágeno da pele em modelo experimental de DM em ratos. Ainda, estudos prévios realizados pelo nosso grupo, também em modelo experimental de diabetes em ratos, mostraram que as alterações do tecido cutâneo

podem resultar na perda da integridade do tecido, caracterizado por intenso remodelamento da derme e ocasionalmente da hipoderme, sugerindo uma maior suscetibilidade à inflamação. Além disso, foi observado que o aumento dos AGEs muda a estrutura da matriz fibrilar da pele demonstrado pela diminuição do Col I e aumento do Col VI (W. Rosolia Teodoro , V. Protoceovich Toledo, S. Catanozi, A. P. Pereira Velosa, A. dos Santos-Filho, 2016). Além da pele, outro estudo do nosso grupo no modelo de DM em ratos, foi observado o remodelamento de colágeno, em ligamentos, tendões e na sinóvia, caracterizado pela diminuição das fibras de Col I e aumento da expressão das fibras de Col III e Col V nestas estruturas (Atayde et al., 2012).

No trabalho de (Lettmann et al., 2014) foi demonstrado que o aumento na expressão nos genes do Col VI, normalmente resulta na expressão alterada desta proteína e que este fato é encontrado com frequência em miopatias. Ainda, o aumento da expressão de Col VI também foi mostrado em fibrose renal de pacientes com DM2 com doença renal crônica. Neste sentido, também foi demonstrado que o aumento na expressão do Col VI é um fator prognóstico para a progressão da nefropatia membranosa idiopática e diagnóstico de doença renal em pacientes com DM2 (Marder et al., 1995; Wu et al., 2001).

O aumento no depósito de Col VI também foi relatado “*in situ*” em pacientes com DM2, no qual é observado um aumento da deposição de Col VI, através das lesões nodulares, e aparentemente substitui o Col IV na membrana basal glomerular (Nerlich et al., 1994). Já em um estudo em pacientes com DM2 e microalbuminúria, sem histórico ou sintomas de doença arterial coronariana, foi demonstrado que os níveis mais altos de um fragmento, encontrado no soro e urina, que reflete a formação de Col VI, é um indicador independente de eventos cardiovasculares, perda de função renal e mortalidade (Rasmussen et al., 2018). Em suma, o aumento da expressão do Col VI em miopatias e doença renal diabética já estão estabelecidos, porém até o momento não se sabe a relação da expressão do Col VI na pele de pacientes com DM2 e alterações cutâneas, como retardo na cicatrização.

Figura 5 - Estruturas, montagem e secreção do colágeno tipo VI. Figura representativa e modificada de (Cescon et al., 2015).

Atualmente têm sido estudadas várias alternativas terapêuticas voltadas para a melhora da angiogênese e do remodelamento de colágeno na pele, que podem auxiliar o processo de cicatrização de úlceras, como a terapia de pressão subatmosférica, além da radiofrequência, ultrassom e luz de LED (Zhang et al., 2014).

Além disso, têm sido utilizados curativos contendo colágeno, no tratamento de úlceras de membro inferior relacionadas ao DM. Estes curativos são preparados a partir de uma matriz constituída de colágeno, proveniente de pele bovina, porcina e equina. A principal ação destes curativos é estabilizar os componentes vasculares e celulares, que se incorporam ao leito da ferida (Landsman et al., 2009). Embora existam várias limitações nos estudos, os achados preliminares da utilização destes curativos no tratamento de úlceras de pé diabético têm sido promissores (Holmes et al., 2013). No entanto, a importância da distribuição da MEC, principalmente relativo a distribuição dos tipos de colágeno e elastina na integridade e qualidade da pele.

Portanto, nosso objetivo será avaliar se os AGEs e seu receptor RAGE podem alterar a distribuição dos diferentes tipos de colágeno e interferir na interação célula-matriz, em biópsias de pele de membro inferior de pacientes com DM.

OBJETIVO

Tendo em vista que a hiperglicemia gera os AGEs, que altera o metabolismo de indivíduos com DM, resultando em mudanças na estrutura das proteínas da matriz cutânea comprometendo a função celular e a cicatrização, nosso objetivo foi avaliar a expressão de RAGE, delinear um perfil das proteínas da matriz cutânea e relacionar com as alterações epiteliais no DM.

MÉTODOS

Casuística

Este projeto de pesquisa foi desenvolvido após aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq: nº: 4.294.045, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo.

Este é um estudo prospectivo, consecutivo, não randomizado, realizado no período de 2019, com pacientes do Serviço de Cirurgia Vascular internados eletivamente ou no Pronto Socorro.

Sendo assim, foram selecionados, 23 pacientes, sendo 7 pacientes não diabéticos e 16 pacientes diabéticos, que passaram por procedimento cirúrgico de amputação em membro inferior (MMII), em acompanhamento no Ambulatório da Cirurgia Vascular do Hospital das Clínicas – Universidade de São Paulo. As características clínicas desses pacientes são demonstradas no Anexo 1.

Crítérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos pacientes portadores de DM2 e pacientes sem DM, todos com comprometimento vascular. Todos os pacientes foram submetidos a cirurgia de amputação de membros inferiores, devido à presença de feridas crônicas em membros inferiores, com ou sem tratamentos prévios. Não houve restrições para idade, gênero ou etnia.

Foram excluídos os portadores de DM1 e condições clínicas associadas que modifiquem o processo de cicatrização da ferida, tais como doenças autoimunes ou imunossupressoras, anemias e/ou parasitoses cutâneas.

Todos os pacientes selecionados para esse estudo participaram de reunião inicial, onde o projeto foi explicado, dúvidas foram esclarecidas e quando não houve mais questionamentos o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – anexo 1), no qual apontou os riscos e benefícios, como também etapas do processo e duração de cada parte, foi assinado. Foram resguardados os direitos de qualquer participante desistir do estudo, no momento que achasse conveniente.

Coleta das amostras

Após terem sido efetuadas as amputações do membro inferior, este foi realocada em uma bancada dentro da sala de cirurgia e as amostras de tecido cutâneo, necessárias para o estudo, foram retiradas. Essas amostras de pele foram retiradas o

mais próximo possível (cerca de 5 cm) do local de incisão do corte da amputação do membro, utilizando pinças e bisturi, seguindo rigorosas condições adequadas de assepsia e antissepsia. A coleta dos referidos fragmentos foi realizada por um médico pertencente ao grupo da Cirurgia Vascular do HCFMUSP, devidamente habilitado e capacitado para tal procedimento. Como controles, foram usadas pele de pacientes que não tivessem diabetes ou qualquer doença associada, como descrito nos itens de inclusão e exclusão.

Figura 6 - Ilustração representativa do membro inferior (MMII) após ser amputado. Está demarcado com uma linha (preta) a distância de cerca de 5 cm, que delimita o ponto de incisão cirúrgica até o local de retirada dos tecidos e, com um retângulo (preto) a região no qual foram retiradas as amostras de tecido para este estudo.

Análise morfológica da pele

Avaliação anatomopatológica da pele dos pacientes diabéticos

As amostras de pele coletadas de membro inferior dos pacientes amputados foram imersas em formol a 10% tamponado e mantidas aproximadamente por 24 horas. Posteriormente, estas amostras foram submetidas aos procedimentos histológicos de rotina. Subsequentemente, foram realizados cortes de 3-4 μ m e corados com H&E, para avaliação da estrutura e celularidade, assim como a distribuição e organização das fibras

colágenas. Para avaliação das fibras elásticas, os cortes foram corados com Resorcina-Fucsina oxidada e não oxidada.

As amostras de pele foram analisadas em microscópio óptico de transmissão, por dois observadores independentes, para fins de diagnóstico de consenso.

Imunofluorescência do colágeno dos tipos I, III, V, VI e RAGE

Para identificar os colágenos do tipo I, III, V, VI e RAGE, cortes de 4µm de espessura da biópsia de pele de pacientes diabéticos foram aderidas em lâminas silanizadas e polarizadas (Knittel Glass, Alemanha). Inicialmente, as lâminas foram imersas em xilol aquecido a 60°C, por cerca de 40 minutos, e por dois banhos de 10 minutos em xilol a 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 tampão fosfato de sódio pH=7,0 (PBS). Para recuperação dos sítios antigênicos, os cortes foram submetidos à digestão com pepsina de mucosa de estômago de porco (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, 10000 UTI/ml), 10mg/ml em ácido acético 0,5N, por 40 minutos, a 40°C. Ao término desta incubação, os cortes foram submetidos a um ciclo de lavagens com PBS, por três vezes de 10 minutos. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado através da incubação dos cortes com BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis) 5%, durante 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas, por uma noite a 4°C, com anticorpos policlonais de coelho anti-Col I, III, V, VI e RAGE, 1:1400, 1:200, 1:1000, 1:2600 e 1:50, respectivamente, diluídos em BSA 0,01% (Tabela 1). Após este período, os cortes foram submetidos a um ciclo de lavagens com PBS/Tween20 0,05%, por três vezes de 10 minutos, e incubados por 60 minutos, à temperatura ambiente, com o anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Life Technology), diluído 1:200 em PBS com azul de Evans 0,006%. Os cortes foram novamente lavados com PBS/Tween20 0,05% e as lâminas montadas em lamínulas com glicerina/PBS (v/v), para a análise no microscópio de fluorescência *Olympus BX51* (Olympus Co, Tokyo, Japan).

Tabela 1- Anticorpos anti-colágeno dos tipos I, III, V e VI e anti-RAGE

Marcador	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
Col I	Anti-Col I, policlonal de coelho (Rockland)	Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (ALEXA FLUOR 488, Invitrogen, Life Technologies)
Col III	Anti-Col III, policlonal de coelho (Rockland)	Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (ALEXA 488, Invitrogen, Life technologies)
Col V	Anti-Col V, policlonal de coelho (Rockland)	Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (ALEXA 488, Invitrogen, Life Technologies)
Col VI	Anti-Col VI, policlonal de Coelho (Rockland)	Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (ALEXA 488, Invitrogen, Life Technologies)
RAGE	Anti-RAGE, monoclonal de camundongo (Abcam)	Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (ALEXA 488, Invitrogen, Life Technologies)

Dupla Imunomarcção para o Colágeno dos tipos I, IV, VI, actina, citoqueratina, E-caderina, elastina, fibrilina, vimentina e RAGE

Para identificar o colágeno dos tipos I, IV, VI, actina, citoqueratina, E-caderina, elastina, fibrilina, vimentina e RAGE, os cortes de 4µm de espessura da biópsia de pele de pacientes diabéticos e não diabéticos foram aderidos em lâminas silanizadas e polarizadas (Knittel Glass, Alemanha). Inicialmente, as lâminas foram imersas em xilol aquecido a 60°C, por cerca de 40 minutos, e dois banhos de 10 minutos em xilol a 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 tampão fosfato de sódio pH=7,0 (PBS). Para recuperação dos sítios antigênicos, os cortes foram submetidos à digestão com pepsina de mucosa de estômago de porco (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, 10000 UTI/ml), 10mg/ml em ácido acético 0,5N, por 40 minutos, a 40°C. Ao término desta incubação os cortes foram submetidos a um ciclo de lavagens com PBS, por três vezes de 10 minutos. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com um ciclo de 4 lavagens de 5 min com água oxigenada 3%, seguido de água corrente, água destilada e, por último, as lâminas foram colocadas em tampão PBS com Tween 20, por 5 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram incubadas, por uma noite a 4°C, com anticorpos policlonais anti-Col I, IV, VI, actina, citoqueratina, E-caderina, elastina, fibrilina, vimentina e RAGE, 1:1500, 1:100, 1:1500, 1:100, 1:100, 1:100, 1:50, 1:50, 1:100 e 1:350, respectivamente, diluídos em PBS (Tabela 2). Após este período, os cortes foram

submetidos a um ciclo de lavagens com PBS/Tween20 0,05%, por três vezes de 10 minutos, e incubados por 60 minutos, à temperatura ambiente, com o anticorpo conjugado Alexa Fluor (Invitrogen, Life Technology) diluído 1:200 em PBS (Tabela 2). A marcação dos núcleos das células foi realizada pela incubação com DAPI (ab104139 Abcam Cambridge UK) por 15 minutos. Os cortes foram novamente lavados com PBS/Tween20 0,05% e as lâminas montadas em lamínulas com glicerina/PBS (v/v), para a análise no microscópio de fluorescência *Olympus* BX51 (Olympus Co, Tokyo, Japan).

Tabela 2- Anticorpos anti-colágenos dos tipos I, III, V e VI e anti-RAGE

Marcador	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
Col I	Anti-Col I, policlonal de coelho (Rockland)	Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (ALEXA FLUOR 488, Invitrogen, Life Technologies) e Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (ALEXA 546, Invitrogen, Life Technologies)
Col IV	Anti-Col IV, monoclonal de camundongo (Sigma Aldrich)	Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (ALEXA 546, Invitrogen, Life Technologies)
Col VI	Anti-Col VI, policlonal de Coelho (Rockland)	Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (ALEXA 488, Invitrogen, Life Technologies) e Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (ALEXA 546, Invitrogen, Life Technologies)
Actina	Anti-Actina, monoclonal de camundongo clone 1 A 4 (Dako)	Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (ALEXA 546, Invitrogen, Life Technologies)
Citoqueratina	Anti-Citoqueratina, monoclonal de camundongo clone EA1/EA3 (Dako)	Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (ALEXA 546, Invitrogen, Life Technologies)
E-caderina	Anti-E-caderina, policlonal de Coelho (Boster Biological Technology)	Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (ALEXA 488, Invitrogen, Life Technologies)
Elastina	Anti-Elastina, policlonal de Cabra (Santa Cruz Biotechnology)	Anticorpo de coelho anti-IgG de cabra (ALEXA 488, Invitrogen, Life Technologies)
Fibrilina	Anti-Fibrilina, policlonal de Coelho (Abcam)	Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (ALEXA 546, Invitrogen, Life Technologies)
Vimentina	Anti-Vimentina, monoclonal de camundongo clone V9 (Dako)	Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (ALEXA 546, Invitrogen, Life Technologies)
RAGE	Anti-RAGE, monoclonal de camundongo (Abcam)	Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (ALEXA 488, Invitrogen, Life Technologies)

Quantificação dos colágenos e RAGE na pele de pacientes não diabéticos e diabéticos

Histomorfometria do colágeno dos tipos I, III, V e VI e RAGE

A análise histomorfométrica foi realizada para quantificar os Col I, Col III, Col V, Col VI e RAGE nas amostras de tecido cutâneo de pacientes diabéticos e não diabéticos, por meio de um sistema de análise de imagens. O sistema consiste de uma câmera fotográfica CCD Sony, acoplada a um microscópio *Olympus* BX51 (*Olympus*

Co, Tokyo, Japan), a qual captura as imagens e as envia para o monitor por um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canadá). As imagens foram processadas por meio do *software ImagePro-Plus 6.0*. A análise foi realizada por observador, às cegas, sendo adquiridas aleatoriamente 10 imagens de cada caso, em aumento de 400 vezes. A área de cada campo analisado foi medida em μm^2 . Para a quantificação de Col I, Col III, Col V e Col VI foram utilizados os recursos do *software ImagePro-Plus 6.0*, de seleção de cores, onde a tonalidade verde fluorescente, que identificou os diferentes tipos de colágenos foi selecionada e quantificada (Figura 7). A média da área do conteúdo de cada um dos tipos de colágeno foi dividida pela média da área total analisada e o resultado final expresso em porcentagem. Para a quantificação das células imunomarcadas com RAGE foi utilizado o método estereológico de contagem de pontos de acordo com (Gundersen et al., 1988), com modificações. Utilizando-se os recursos de medidas do *ImagePro-Plus 6.0* foi construído um retículo com 100 pontos, distribuídos ortogonalmente sobre a imagem adquirida (Figura 8). A expressão de RAGE foi determinada de acordo como o número de células positivas (miofibroblastos, glândulas e vasos sanguíneos), coincidentes com os pontos do retículo em cada campo, sendo expressa como uma proporção da área total do tecido analisado.

Figura 7 - Ilustração representativa da quantificação das fibras de colágeno I, III, V e VI (verde fluorescente) na região dérmica, por análise de imagem. A) Colágeno imunomarcado em verde fluorescente. B) Em vermelho está demarcada a expressão correspondente aos tipos de colágeno. C) Área total quantificada pelo software *ImagePro-Plus 6.0*.

Figura 8 - Ilustração representativa da quantificação da expressão de RAGE na região dérmica, por análise de imagem, com o software *ImagePro-Plus* 6.0. A) Imunomarcação para RAGE (verde fluorescente). B) As cruzes em vermelho representam o retículo com 100 pontos, distribuídos ortogonalmente sobre a imagem.

Avaliação da expressão dos genes *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *COL6A3*, *TGFB1*, *MMP-1*, *MMP-2*, *AT-1* e *FBN-1* na pele pacientes diabéticos e não diabéticos

Extração de mRNA de amostras de pele de pacientes diabéticos e não diabéticos

Para a análise da expressão dos genes: *COL1A1* (cadeia $\alpha 1$ do colágeno I), *COL3A1* (cadeia $\alpha 1$ do colágeno III), *COL5A1* (cadeia $\alpha 1$ do colágeno V), *COL5A2* (cadeia $\alpha 2$ do colágeno V), *COL6A3* (cadeia $\alpha 3$ do colágeno VI), *TGFB1* (TGF β 1), *MMP-1* (metaloproteinase-1), *MMP-2* (metaloproteinase-2), *AT-1* (angiotensina-1) e *FBN-1* (fibrilina) específicos para tecidos humanos (Tabela 3), em amostras de pele, de pacientes com diabetes e sem diabetes, o RNA total foi extraído pelo método de (Chomczynski and Sacchi, 1987), utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen, Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a separação do RNA após adição de 200 μ l de clorofórmio, as amostras foram rapidamente agitadas, mantidas à temperatura ambiente, por 10 minutos, e submetidas à centrifugação (12.000 RCF), por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para outro tubo de plástico. Para a precipitação do RNA, foram adicionados 500 μ l de álcool isopropílico às amostras, as quais foram homogeneizadas por inversão, mantidas à temperatura ambiente, por 5 minutos, e submetidas à centrifugação (12.000 RCF), por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA diluído em 1ml de etanol (70%) e submetido a nova centrifugação (10 minutos/12.000 RCF/ 4°C). Por fim, o RNA foi dissolvido em 20 μ l de H₂O deionizada, tratada com dietilpirocabonato (DEPEC; Merck, Alemanha), um forte inibidor de ribonucleases. As amostras de RNA foram tratadas com DNase/RNase

Free (Invitrogen, Life Technologies), com a finalidade de evitar-se contaminação com qualquer tipo de DNA remanescente.

Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA por espectrofotometria

A avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de mRNA foram feitas a partir de 2µl da amostra de RNA dissolvida em 20 µl de H₂O deionizada, tratada com dietilpirocarbonato (DEPEC; Merck, Alemanha). A leitura no espectrofotômetro (Nano Vueplus; GE) foi determinada através da leitura da absorbância, em comprimento de onda de 260nm e 280nm. A relação entre as leituras obtidas (260/280) deve estar entre 1,7 e 2,0 para obtenção de RNA com grau com alto grau de pureza.

Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real (qRT-PCR)

Para a reação de qRT-PCR foram selecionados 10 genes de interesse: *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *COL6A3*, *TGFβ1*, *MMP-1*, *MMP-2*, *AT-1* e *FBN-1* específicos para humanos (Tabela 3). As sequências dos genes foram adquiridas pelo site www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. A expressão dos genes foi avaliada por PCR em tempo real, utilizando-se o equipamento *Step One* (Applied Biosystems – Foster City, CA – USA) usando o kit *Super Script III Platinum SYBR Green® One-Step qRT-PCR* (Invitrogen, Life Technologies). Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto a amostra). A expressão diferencial dos transcritos alvos foi determinada através do método de quantificação relativa em relação a um ou mais controles endógenos ou genes normatizadores. Para a análise de expressão gênica relativa, amostras de tecido normal foram utilizadas como referência. As reações de qRT-PCR foram padronizadas para encontrar a melhor temperatura de anelamento para cada gene em estudo. Dessa forma, um único pico de fluorescência foi detectado para cada gene. Foi realizada curva de *melting* (fusão) de cada gene, para identificação de um único pico de fluorescência de cada amostra analisada.

Tabela 3 - Relação das sequências de oligonucleotídeos estudados

Gene	<i>Sense 3' – 5'</i>	<i>Antisense 5' – 3'</i>
<i>GAPDH</i>	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C
<i>COL1A1</i>	AAC AGC CGC TTC ACC TAC AG	TGG GAT GGA GGG AGT TTA CA
<i>COL3A1</i>	GAT GGG GTC AAA TGA AGG TG	TGA TCA GGA CCA CCA ATG TC
<i>COL5A1</i>	GTG GCA CAG AAT TGC TCT CA	TCA CCC TCA AAC AAC TCC TC
<i>COL5A2</i>	TTG ATG GTG GTG CTC ATT GT	GGA AAT GTG GGC AAG ACT GT
<i>COL6A3</i>	CAT CCT TCG TCA GCA GTG AA	TCG TCA CTG GGT TGG ATG TA
<i>TGF-β</i>	CCC TGG ACA CCA ACT ATT GC	GTC CCAG GCT CCA AAT GTA GG
<i>MMP-1</i>	GCT TGA CCC TCA GAG ACC TT	GAT GAA GCA GCC CAG ATG TG
<i>MMP-2</i>	CAG GAT CCA TTT TCT TCT TCA CC	TAC TGG ATC TAC TCA GCC AGC AC
<i>AT-1</i>	AAC ATG GTG CAG GCT TCT TG	CAG ATA TTG TGG ACA CGG CC
<i>FBN-1</i>	CAC TGG AAA GAC CCC ACT GT	TGA TGA CCA AAC CAT GTG CT

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados mediante testes estatísticos para comparação, baseado nos tipos de distribuição das variáveis. As distribuições foram consideradas paramétricas ou não paramétricas segundo o programa estatístico *GraphPad Prism* versão 4.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Os valores obtidos pelos estudos de cada variável contínua foram organizados e descritos pela média e desvio padrão. Para a comparação entre as médias de dois grupos amostrais foi utilizado o teste “*t*” *Student* e para comparação com mais de duas variáveis o ANOVA. Para ser considerada diferença entre médias e frequências ou a presença de correlação entre variáveis foi utilizado o valor de significância estatística menor a 5 % ($p < 0,05$).

A análise de correlação entre grupos de pacientes diabéticos e não diabéticos da expressão das proteínas detectadas pela biologia molecular foi realizada por meio da correlação do teste de *Spearman*, dada a natureza não paramétrica dos dados. O *software* estatístico *IBM SPSS* (versão 22; Armonk, NY, EUA) foi usado para esta análise. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo, e a força da correlação foi estratificada de acordo com o valor rho.

RESULTADOS

Alterações estruturais no tecido cutâneo de pacientes diabéticos

A Figura 9 (A1-A2) mostra cortes representativos de pele, corados com H&E, onde observamos nos pacientes não diabéticos a EP e queratinócitos preservados e uma camada córnea evidente. Ainda, na DP identificamos o tecido conjuntivo frouxo apresentando uma matriz fibrilar homogênea, corada em rosa claro, e discreto infiltrado de células inflamatórias, principalmente de células mononucleares. Na DR identificamos na Figura 9 (A3) a presença de tecido conjuntivo denso com inserções cutâneas, caracterizada pela presença de densas fibras colágenas, capilares, vasos, glândulas e bulbo de folículos pilosos, apresentando um padrão homogêneo em toda sua extensão.

Por outro lado, na Figura 9 (B1-B2) as amostras de pele dos pacientes diabéticos, coradas com H&E, apresentaram-se totalmente alteradas, onde identificamos espessamento da EP com hiperplasia dos queratinócitos e alongamento dos cones epiteliais, evidenciada pela intensa impregnação do corante nessas biopsias. Ainda, exibem denso infiltrado de células mononucleares próximos as projeções das papilas dérmicas em direção à DP, quando comparamos com a pele dos pacientes não diabéticos. No que se refere as fibras colágenas na DP, identificamos fibras mais esparsas, caracterizadas pela coloração tênue no H&E. O mesmo foi visualizado na região da DR, que obedece a um padrão mais intenso na região profunda e está associada à atrofia dos anexos cutâneos, vasculite intensa, conglomerado de células inflamatórias, distribuídas em torno de glândulas, enquanto os vasos apresentam endarterite obliterante característica da pele desses pacientes (Figura 9 B3).

No que se refere às biopsias de pele de pacientes não diabéticos corados por Resorcina-Fucsina, previamente oxidada (Figura 9 C1-C3) e não oxidada (Figura 9 E1-E3), observa-se intensa impregnação do corante de fibras elásticas tanto na DP quanto na DR, estas apresentam formato alongado e espesso ao longo de toda sua extensão formando feixes de fibras em projeção horizontal e vertical. Em contraste, na pele de pacientes com DM, observamos intenso processo de fragmentação das fibras elásticas oxidada, representadas na Figura 9 (D1-D3) e não oxidada na Figura 9 (F1-F3) na derme. As fibras elásticas exibem um padrão escasso nos cortes histológicos, por estarem com aspecto mais afilado, expondo um formato desfragmentado de seus feixes de fibras, quando comparado com a pele dos pacientes não diabéticos.

Figura 9 - Cortes transversais de pele de membros inferiores corados com H&E provenientes de pacientes não diabéticos e diabéticos. Em (A1-A3) notamos histoarquitetura preservada, discreta hiperplasia de queratinócitos (A2), células mononucleares (A2) e distribuição uniforme das fibras do colágeno (A3). Em contraste, a pele de pacientes diabéticos (B1-B3) exibe desorganização da histoarquitetura (B1), proliferação de pequenos vasos na derme (B1), proeminente hiperplasia de queratinócitos com alongamento dos cones epiteliais (B1-B2), denso infiltrado de células mononucleares na derme ao redor dos cones epiteliais (B2-B3). Nota-se proeminente endarterite obliterante de vasos dérmicos e subcutâneos (B3). Na coloração de Resorcina-Fucsina oxidada (C1-C3) (fibras oxitalânicas) e não oxidada (D1-D3) (fibras elaunínicas) da pele de pacientes não diabéticos, observa-se uma intensa cor (púrpura) formando estruturas espessas e alongadas dispostas em toda a região da (PD) e (RD). Na pele dos pacientes diabéticos, a coloração (púrpura) de Resorcina-Fucsina oxidada (D1-D3) e não oxidada (F1-F3) apresentam na (DP) estruturas afiladas e fragmentadas. Notar na região da (DR) o aumento dos espaços interfibrilares e a ausência de feixes de fibras quando comparado com os não diabéticos. Aumento de 100X, 200X e 400X.

Avaliação histomorfométrica das fibras elásticas do tecido cutâneo

A avaliação quantitativa da proporção proliferativa de fibras elásticas oxidadas, apresentada na Figura 10 (A-B) e não oxidadas na Figura 10 (C-D), na pele de pacientes não diabéticos e diabéticos, de maneira geral, mostrou uma grande disparidade na distribuição dessas fibras, tanto na região da DP quanto DR. A proporção das fibras elásticas oxidadas (Figura 10 A $p<0,0001$; B $p<0,0002$) e não oxidadas na (Figura 10 C $p<0,0001$; D $p<0,0001$), na DP e DR, foi quantitativamente maior na pele dos pacientes não diabéticos, quando comparadas com os pacientes diabéticos, em ambas as técnicas de coloração utilizadas.

Figura 10 – Histogramas exibindo a porcentagem de fibras elásticas coradas com Resorcina-Fucsina oxidada e não oxidada, em cortes transversais de pele de pacientes não diabéticos e diabéticos. Resorcina-Fucsina oxidada: Derme Papilar (A $p<0,0001$); Derme reticular (B $p<0,0002$); Resorcina-Fucsina não oxidada: Derme Papilar (C $p<0,0001$); Derme reticular (D $p<0,0002$). *t-test e pós-teste Mann-Whitney* (***) $p<0,05$.

Análise de imunomarcadores dérmicos de colágeno e de anexos

Na Figura 11 (A), identificamos a imunomarcagem das fibras de Col I, distribuído ao longo da membrana basal, acompanhando uma distribuição normal, por toda a derme, depositado uniformemente na parede dos pequenos vasos nos pacientes não diabéticos. Por outro lado, na pele dos pacientes diabéticos (Figura 11 B), observamos diminuição de depósito de Col I na DP, menos proeminente na DR e na parede dos pequenos vasos. Estes resultados corroboram com a avaliação histomorfométrica, das fibras de Col I, onde foi demonstrada diferença significativa na

expressão desta proteína entre os pacientes não diabéticos e diabéticos (Figura 11 C, $p<0,0234$; D, $p<0,0299$).

Na Figura 12 (A-B), observamos as fibras de Col III obedecendo a um padrão homogêneo em todo o tecido cutâneo e não identificamos diferença significativa na proporção desta proteína na pele, tanto dos pacientes não diabéticos quanto dos diabéticos (Figura 12 C-D).

No que se refere à avaliação das fibras de Col V, observamos distribuição mais intensa deste colágeno ao longo da membrana basal, na região da DP na pele dos pacientes não diabéticos (Figuras 13 A), quando comparamos com os diabéticos (Figura 13 B). Mas, na análise estatística não houve diferença significativa na proporção desta proteína na pele dos pacientes não diabéticos e diabéticos (Figura 13 C-D).

Já o Col VI (Figura 14 B), apresentou intensa fluorescência na região da membrana basal e DP da pele dos pacientes diabéticos, quando comparamos com a pele dos não diabéticos na Figura 14 (A). Ainda, observamos um aumento do verde fluorescente, distribuído ao redor de vasos sanguíneos e glândulas na DP, que corrobora com a diferença significativa da expressão deste colágeno nos pacientes diabéticos, (Figura 14 C $p<0,0099$; D $p<0,0140$). Estes dados também são confirmados pela hiperplasia de queratinócitos e alongamento dos cones epiteliais, indicadas na DP do grupo de pacientes diabéticos.

Na Figura 15 (B) demonstramos o aumento da imunomarcação para RAGE nas células endoteliais dos vasos e anexos cutâneos, assim como em fibroblastos da DR dos pacientes diabéticos, em relação aos não diabéticos (Figura 15 A). Este resultado é confirmado pela avaliação quantitativa da expressão deste receptor nos pacientes diabéticos na Figura 15 (C $p<0,0024$).

Colágeno Tipo I

Figura 11 - Imunofluorescência em verde fluorescente de cortes transversais de pele de pacientes diabéticos da expressão do colágeno do tipo I: A - não diabéticos; B - diabéticos; EP – Epiderme; DP – Derme papilar; DR – Derme reticular. (C-D) Representação gráfica da expressão de colágeno tipo I (C, $p < 0,0234$; D, $p < 0,0299$), com maior porcentagem em pacientes não diabéticos. *t-test* e *pós-teste Mann-Whitney* (*) $p < 0,05$. Aumento de 400X. Detalhes ampliados 5X.

Colágeno Tipo III

Figura 12 - Imunofluorescência em verde fluorescente de cortes transversais de pele de pacientes diabéticos da expressão do colágeno do tipo III. A – Pacientes não diabéticos; B – Pacientes não diabéticos; EP – Epiderme; DP – Derme papilar; DR – Derme reticular. (C-D) Representação gráfica da expressão de colágeno tipo III não havendo significância estatística. t-test e pós-teste Mann-Whitney $p < 0,05$. Aumento de 400X. Detalhes ampliados 5X.

Colágeno Tipo V

Figura 13 - Imunofluorescência em verde fluorescente de cortes transversais de pele de pacientes diabéticos da expressão do colágeno do tipo V. A – Paciente não diabético; B - Paciente não diabético; EP – Epiderme; DP – Derme papilar; DR – Derme reticular. (C-D) Representação gráfica da expressão de colágeno tipo V não havendo significância estatística. *t-test* e *pós-teste Mann-Whitney* $p < 0,05$. Aumento de 400X. Detalhes ampliados 5X.

Colágeno Tipo VI

Figura 14 - Imunofluorescência em verde fluorescente de cortes transversais de pele de pacientes diabéticos da expressão do colágeno do tipo VI. A – Pacientes não diabéticos; B – Pacientes diabéticos; EP – Epiderme; DP – Derme papilar; DR – Derme reticular. Representação gráfica da expressão de colágeno tipo VI (C $p < 0,0099$) e (D $p < 0,0140$) com maior porcentagem quantitativa nos pacientes diabéticos. *t-test* e pós-teste *Mann-Whitney* (**) $p < 0,05$. Aumento de 400X. Detalhes ampliados 5X.

Figura 15 - Imunofluorescência (verde fluorescente) para RAGE em cortes transversais de pele de pacientes. A – Pacientes não diabéticos; B – Pacientes diabéticos; DR – Derme reticular. C – Representação gráfica da expressão de RAGE ($p < 0,0024$), com maior porcentagem nos pacientes diabéticos. *t-test* e pós-teste *Mann-Whitney* (**) $p < 0,05$. D e E – Representação da Imunomarcagem dos núcleos celulares com DAPI. Aumento de 400X. Detalhes ampliados 5X.

Marcadores epiteliais e mesenquimais na pele

Na Figura 16 (C1) mostra uma maior expressão de citoqueratina nas células epidérmicas, que se estende dos queratinócitos na região suprabasal até a camada

granular no tecido de paciente diabético. Por outro lado, identificamos um grande aumento na expressão do Col VI nos tecidos dos pacientes diabéticos (Figura 16 B1), distribuído ao longo da membrana basal e em pequenos vasos na DP. Além disso, a co-localização entre a expressão de citoqueratina de queratinócitos e do Col VI na membrana basal, apresenta-se anormal no tecido cutâneo dos diabéticos, conferindo um fenótipo alterado na EP e na membrana basal da pele de diabéticos (Figura 16 D1).

Entretanto, a fim de explorar a ocorrência de um processo semelhante a transição epitélio mesênquima nas amostras de pele de membros inferiores de pacientes não diabéticas e diabéticas, a pele foi imunomarcada com marcadores epiteliais e mesenquimais, como a actina, E-caderina e vimentina, e proteínas da membrana basal, como Col IV e Col VI.

A imunomarcção mostrou forte birrefringência para E-caderina em células de pacientes diabéticos na região da EP, mas não em tecidos dos não diabéticos (Figura 16 F1). Ainda, a co-localização de E-caderina em queratinócitos e Col IV na membrana basal de pacientes diabéticos apresenta-se comprometida pela espessura proeminente da EP e membrana basal, em comparação com pacientes não diabéticos (Figura 16 F-G). Além disso, a imunomarcção de Col VI e vimentina revelou diferença na expressão de E-caderina (Figura 16 F-F1), entre os compartimentos cutâneos dos não diabéticos e diabéticos. Já a expressão de células positivas para vimentina foi mais intensa na DP de pacientes diabéticos (Figura 16 K1), mas não na DP de não diabéticos (Figura 16 K-O). É importante notar a forte birrefringência amarela da co-localização entre Col VI e vimentina (Figura 16 L1). Adicionalmente, é importante salientar a transição epitélio mesenquimal, modulada por queratinócitos e Col IV/VI, que exibe um fenótipo de fibroelastose anormal na pele diabéticos.

Na Figura 17 (F), demonstramos intenso aumento da imunomarcção para Col VI na DP e do Col IV (Figura 17 G) na JDE, do tecido cutâneo de pacientes diabéticos. No que se refere ao Col I na Figura 17 (N) identificamos uma intensa diminuição deste tipo de colágeno no grupo de pacientes diabéticos, quando comparados aos não diabéticos (Figura 17 J) e intenso aumento do Col VI na DP dos diabéticos (Figura 17 O).

Na Figura 18 (B) observamos intensa expressão de elastina na região da DP em pacientes não diabéticos, formando uma rede que está presente em todo o tecido, desde a JDE até no início da DR. Ainda, observamos a imunomarcção, positiva para fibrilina exibindo feixes de fibras na DP desses pacientes (Figura 18 C).

Já no tecido de pacientes diabéticos a imunomarcção de elastina (Figura 18 B1), apresenta-se sob a forma de pequenos grumos na região mais profunda da DP. Este mesmo padrão de marcação pode ser visto para fibrilina na Figura 18 (C1). Esses marcadores mostram grande diferença na expressão de elastina e fibrilina nesta região tecidual, indicando uma deficiência tanto de elastina como de fibrilina na pele de pacientes diabéticos, como podemos observar nas imagens de dupla marcação na Figura 18 (D e D1).

Na Figura 18 (F), observamos intensa expressão da elastina na região do DP na pele de pacientes não diabéticos e uma tênue expressão de Col VI (Figura 18 G). Em contraste, nos diabéticos a imunomarcção para elastina obedeceu a um padrão em forma de grumos na região da DP (Figura 18 F1) e intensa expressão de Col VI, principalmente, na região da membrana basal e em anexos teciduais (Figura 18 G1).

Já na Figura 18 (J), observou-se intensa fluorescência do Col I na região do DP em pacientes não diabéticos e da expressão de fibrila formando feixes de fibras ao longo da DP (Figura 18 K). Ao contrário, na Figura 18 (J1) mostramos uma tênue expressão de Col I, e a grande formação de grumos de fibrilina no tecido cutâneo dos diabéticos (Figura 18 K1).

Na Figura 19 (B1 e F1) identificamos uma intensa fluorescência na imunomarcção para RAGE em células endoteliais de vasos cutâneos e anexos, bem como em fibroblastos na região da DR em pacientes diabéticos, quando comparado aos pacientes não diabéticos (Figura 19 B e F). Já o Col I (Figura 19 G1), apresenta intensa marcação nos vasos sanguíneos, os quais apresentam-se mais fibrosos e espessos, no tecido cutâneo de pacientes diabéticos (Figura 19 G).

Figura 16 – Imunofluorescência em cortes transversais de pele de pacientes diabéticos e não diabéticos. Notar em B1 aumento de colágeno VI na DP (verde fluorescente), intensa expressão de citoqueratina (C1) (Vermelho) e E-caderina (F1) (verde fluorescente) na epiderme. Na junção dermoepidérmica observamos aumento de colágeno IV (G1) (vermelho) e vimentina na região DP (K1) (vermelho) e aspecto normal da expressão de actina (O1) (vermelho) na pele do paciente diabético. Notar os núcleos celulares DAPI (azul) e co-localização (D-D1, H-H1, L-L1, P-P1) na pele do não diabético e diabético. Ampliação de 400X.

Figura 17 – Imunofluorescência em cortes transversais de pele de pacientes diabéticos e não diabéticos. Notar em F aumento de colágeno VI na DP (verde fluorescente), intensa expressão de colágeno IV (vermelho) na junção dermoepidérmica e colágeno VI na região DP (O) (vermelho) e diminuição de colágeno I (N) na DP. Em contraste, observamos aspecto normal da expressão de colágeno I (J) (verde fluorescente) na pele do paciente não diabético. Notar os núcleos celulares DAPI (azul) e co-localização (D, H, L, P) na pele do não diabético e diabético. Ampliação de 400X.

Figura 18 – Imunofluorescência em cortes transversais de pele de pacientes diabéticos e não diabéticos. Notar em B1 e F1 expressão tênue de elastina (verde fluorescente), expressão em forma de grumos de fibrilina (C1e K1) (Vermelho), aumento de colágeno VI (G1) (vermelho) e diminuição de colágeno I (J1) na DP na pele de pacientes diabéticos. Em contraste, observamos aumento da expressão de elastina (B e F) e colágeno I (J) (verde fluorescente), fibrilina (C e K) apresentam padrão normal, e baixa expressão de colágeno VI (G) na DP em pacientes não diabéticos. Notar os núcleos celulares DAPI (azul) e co-localização (D-D1, H-H1, L-L1) na pele do não diabético e diabético. Ampliação de 400X.

Figura 19 – Imunofluorescência em cortes transversais de pele de pacientes diabéticos e não diabéticos. Notar em B1 e F1 aumento da expressão de RAGE (verde fluorescente), expressão aumentada de colágeno I (G1) (vermelho) na DR de pacientes diabéticos. Em contraste, observamos baixa expressão de RAGE (B e F) (verde fluorescente), expressão normal de colágeno I (G) (vermelho) na DR de pacientes não diabéticos. Em ambos os casos a expressão de colágeno VI mostrou ser tênue (C e C1) na DR. Notar os núcleos celulares DAPI (azul) e co-localização (D-D1, H-H1) na pele do não diabético e diabético. Ampliação de 400X.

Análise da expressão gênica do *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *COL6A3*, *TGFβ1*, *MMP-1*, *MMP-2*, *AT-1* e *FBN-1* no tecido cutâneo

Para avaliar a expressão dos genes de *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *COL6A3*, *TGFβ1*, *MMP-1*, *MMP-2*, *AT-1* e *FBN-1* por qRT-PCR, o mRNA foi extraído do tecido cutâneo de pacientes não diabéticos e com diabetes.

A análise dos resultados demonstrou um aumento significativo na expressão relativa para os genes *COL1A1* (Figura 20 A $p < 0,0070$), *COL5A1* (Figura 20 C $p < 0,0190$), *COL5A2* (Figura 20 D $p < 0,0242$), *COL6A3* (Figura 20 E $p < 0,0028$) e *FBN-1* (Figura 20 J $p < 0,0414$). No entanto, nenhuma diferença foi encontrada na expressão dos genes *COL3A1*, *TGFβ1*, *MMP-1*, *MMP-2* e *AT-1* na pele de diabéticos quando comparados a pacientes não diabéticos.

Figura 20 – Ilustração gráfica da expressão relativa dos genes para *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *COL6A3*, *TGFβ1*, *MMP-1*, *MMP-2*, *AT-1* e *FBN-1* no tecido cutâneo de pacientes não diabéticos e diabéticos. Notar aumento significativo no quadro (A $p < 0,0070$), (C $p < 0,0190$), (D $p < 0,0242$), (E $p < 0,0028$) e (J $p < 0,0414$). *t*-test e pós-teste Mann-Whitney (**) $p < 0,05$.

Análise de correlação entre grupos de pacientes não diabéticos e diabéticos

Usando os dados retirados das quantificações histológicas, observamos que em pacientes não diabéticos ocorre uma correlação “muito forte” representada por $\rho \geq 0,8$, entre os marcadores de Col I e Col V, Col III e Col V. Também observamos uma “forte” correlação ($0,6 \leq \rho < 0,8$) entre Col VI e Col I, Col I e Col III. Já nos dados referentes aos pacientes diabéticos, observamos uma “forte” correlação ($\rho \geq 0,6$) entre Col VI e Col I, Col I e Col III, Col I e Col V, e Col III e Col V e correlação “moderada” ($0,3 \leq \rho < 0,6$) entre RAGE e Col V, Col VI e Col III, Col VI e Col V. Em contraste, observamos correlação “moderada negativa” ($-0,6 > \rho \geq -0,3$) entre Fibra elástica e Col I, Fibra elástica e Col III visto na Tabela 4. É interessante destacar que algumas correlações estão presentes em ambos os pacientes, mas algumas só pudemos notar em um dos grupos como representado na Tabela 6.

Nossos dados de correlação de biologia molecular vistos na Tabela 5 mostram que em pacientes não diabéticos ocorreu uma correlação “muito forte” ($\rho \geq 0,8$) entre *COL1A1* e *COL3A1*, *COL1A1* e *FBN-1*, *COL5A1* e *COL5A2*, *COL6A3* e *FBN-1*. Além disso, observamos uma correlação “perfeita” entre *COL3A1* e *MMP-2*. Já, em pacientes diabéticos, observamos uma correlação “muito forte” ($\rho \geq 0,8$) entre *COL1A1* e *COL5A1*, *COL1A1* e *COL5A2*, *COL1A1* e *COL6A3*, *COL5A1* e *COL5A2*, *COL5A1* e *COL6A3*, *COL5A2* e *COL6A3*, e uma correlação “forte” ($\rho \geq 0,6$) entre *MMP-2* e *FBN-1*. Da mesma forma apresentada na técnica usando os dados os dados histológicos, a avaliação da expressão gênica por qRT-PCR desses grupos também apresentam diferenças entre algumas correlações na Tabela 6

Tabela 4 - Correlação entre expressões de proteínas usando resultados de imunofluorescência (correlação de Spearman).

Não Diabético											
RAGE		FIBRA		COL VI		COL I		COL III		COL V	
ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>
-	-	-0.381	0.352	-0.262	0.531	-0.238	0.570	-0.238	0.570	-0.262	0.531
-0.381	0.352	-	-	-0.455	0.138	-0.244	0.401	-0.132	0.668	-0.236	0.437
-0.262	0.531	-0.455	0.138	-	-	0.629	0.028	0.503	0.095	0.462	0.131
-0.238	0.570	-0.244	0.401	0.629	0.028	-	-	0.780	0.002	0.802	0.001
-0.238	0.570	-0.132	0.668	0.503	0.095	0.780	0.002	-	-	0.896	0.000
-0.262	0.531	-0.236	0.437	0.462	0.131	0.802	0.001	0.896	0.000	-	-
Diabético											
RAGE		FIBRA		COL VI		COL I		COL III		COL V	
ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>
-	-	-0.289	0.296	0.446	0.095	0.336	0.221	0.268	0.334	0,536	0,040
-0.289	0,296	-	-	-0.175	0,356	-0,483	0,007	-0,390	0,040	-0,294	0,115
0.446	0,095	-0.175	0,356	-	-	0,616	0,000	0,573	0,001	0,535	0,002
0.336	0,221	-0,483	0,007	0,616	0,000	-	-	0,695	0,000	0,734	0,000
0.268	0,334	-0,390	0,040	0,573	0,001	0,695	0,000	-	-	0,756	0,000
0,536	0,040	-0,294	0,115	0,535	0,002	0,734	0,000	0,756	0,000	-	-

Abreviações:

*FIBRA (Fibra Elástica)

Nota: Os valores a negrito referem-se a um valor P com significância estatística ($P < 0,05$).**Tabela 5** - Correlação entre expressões de proteínas usando resultados de biologia molecular (correlação de Spearman).

Não Diabético																
COL1A1		COL3A1		COL5A1		COL5A2		COL6A3		MMP-1		MMP-2		FBN-1		
	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P
COL1A1	-	-	0.500	0.667	0.657	0.156	0.600	0.208	0.829	0.042	-0.500	0.667	0.314	0.544	0.829	0.042
COL3A1	0.500	0.667	-	-	0.500	0.667	0.500	0.667	0.500	0.667	-0.371	0.468	1.000		0.500	0.667
COL5A1	0.657	0.156	0.500	0.667	-	-	0.943	0.005	0.143	0.787	-0.500	0.667	0.771	0.072	0.314	0.544
COL5A2	0.600	0.208	0.500	0.667	0.943	0.005	-	-	0.086	0.872	-0.500	0.667	0.714	0.111	0.429	0.397
COL6A3	0.829	0.042	0.500	0.667	0.143	0.787	0.086	0.872	-	-	-0.500	0.667	-0.086	0.872	0.829	0.042
MMP-1	-0.500	0.667	-0.371	0.468	-0.500	0.667	-0.500	0.667	-0.500	0.667	-	-	0.500	0.667	-0.500	0.667
MMP-2	0.314	0.544	1.000		0.771	0.072	0.714	0.111	-0.086	0.872	0.500	0.667	-	-	0.029	0.957
FBN-1	0.829	0.042	0.500	0.667	0.314	0.544	0.429	0.397	0.829	0.042	-0.500	0.667	0.029	0.957	-	-
Diabético																
COL1A1		COL3A1		COL5A1		COL5A2		COL6A3		MMP-1		MMP-2		FBN-1		
	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P	ρ	P
COL1A1	-	-	0.714	0.111	0,818	0,004	0,927	0,000	0,846	0,001	0.257	0.623	0.343	0.276	0.350	0.265
COL3A1	0.714	0.111	-	-	0.500	0.391	0.500	0.391	0.657	0.156	-0.014	0.996	0.371	0.468	0.771	0.072
COL5A1	0,818	0,004	0.500	0.391	-	-	0,842	0,002	0,830	0,003	0.400	0.505	0.333	0.347	0.394	0.260
COL5A2	0,927	0,000	0.500	0.391	0,842	0,002	-	-	0,964	0,000	0.400	0.505	0.321	0.365	0.382	0.276
COL6A3	0,846	0,001	0.657	0.156	0,830	0,003	0,964	0,000	-	-	0.600	0.208	-0.035	0.914	0.133	0.381
MMP-1	0.257	0.623	-0.014	0.966	0.400	0.505	0.400	0.505	0.600	0.208	-	-	-0.143	0.787	0.257	0.623
MMP-2	0.343	0.276	0.371	0.468	0.333	0.347	0.321	0.365	-0.035	0.787	-0.143	0.787	-	-	0,734	0,007
FBN-1	0.350	0.265	0.771	0.072	0.394	0.260	0.382	0.276	0.133	0.681	0.257	0.623	0,734	0,007	-	-

Abreviações:

Nota: Os valores a negrito referem-se a um valor P com significância estatística ($P < 0,05$).

Tabela 6 - Comparação da correlação da expressão de proteínas entre grupos de pacientes não diabéticos e diabéticos.

IMUNOFLUORESCÊNCIA								
	RAGE	FIBRA	COL VI	COL I	COL III	COL V		
RAGE	-							
FIBRA		-						
COL VI			-					
COL I				-				
COL III					-			
COL V						-		
BIOLOGIA MOLECULAR								
	COL1A1	COL3A1	COL5A1	COL5A2	COL6A3	MMP-1	MMP-2	FBN-1
COL1A1	-							
COL3A1		-						
COL5A1			-					
COL5A2				-				
COL6A3					-			
MMP-1						-		
MMP-2							-	
FBN-1								-

Não Diabético	Diabético	Correlação
		Perfeito
		Muito Forte
		Forte
		Moderado

DISCUSSÃO

Nosso objetivo neste estudo foi avaliar a expressão de RAGE, delinear um perfil de fragilidade na matriz cutânea e relacionar com as alterações epiteliais na pele de pacientes diabéticos. Demonstramos que a hiperglicemia e a glicação, indicadas pelo aumento de RAGE, alteram as fibras elásticas, principalmente a fibrilina-1, bem como o conteúdo e distribuição do Col VI, refletindo na proliferação epitelial pelo aumento da expressão da E-caderina e Citoqueratina. A compreensão desse processo pode auxiliar na formação de um perfil matricelular, indicando a fragilidade da pele e consequentemente, a dificuldade da cicatrização em pacientes com DM e na sugestão de novas abordagens terapêuticas.

Já é estabelecido que a persistência dos níveis hiperglicêmicos no corpo afeta substancialmente as reações intra e extracelulares devido a diversos mecanismos químicos e bioquímicos, que são ativados para compensar a ação da insulina e o aumento da glicose circulante (Pozzilli and Di Mario, 2001). A hiperglicemia ativa as vias de sinalização, as quais favorecem o estresse oxidativo e a inflamação, levando à ativação do que é conhecido como eixo AGE-RAGE, resultante do aumento das concentrações plasmáticas de AGEs e subsequente ativação de RAGE, que atua como um poderoso indutor de vias pró-inflamatórias, promovendo a síntese de citocinas como o TNF- α , Interleucina (IL), VCAM-1 e até mesmo o aumento de ROS, que tem efeitos deletérios na macro e microvasculatura de órgãos-alvo afetados no DM (Salazar et al., 2021). Neste estudo, observamos aumento do RAGE nos vasos sanguíneos e na MEC da pele de pacientes diabéticos em relação aos não diabéticos, acompanhado de densas fibras de colágeno, capilares, vasos, glândulas e bulbo dos folículos capilares, homogêneos em toda sua extensão. Além disso, na DP de pacientes diabéticos observamos um padrão fragmentado das fibras colágenas e estruturas fibrilares, que se intensifica para a região mais profunda da derme, associado à atrofia dos anexos cutâneos, vasculite intensa e células inflamatórias, distribuídas em torno das glândulas seromucosas, enquanto os vasos apresentam obliteração e endarterite, característica da pele de pacientes diabéticos. Ainda estas alterações foram detectadas predominantemente em pacientes que apresentaram aumento dos receptores RAGE sugerindo, que o remodelamento das proteínas da MEC está diretamente relacionado com a presença da glicação. Outro aspecto de grande importância nos vasos de pacientes diabéticos é a ativação de receptores de angiotensina II, denominados AT-1, que além de promoverem a aterogênese, podem induzir estresse oxidativo. De fato, a

ativação da angiotensina II em células endoteliais vasculares humanas provoca a formação de espécies reativas de oxigênio, via ativação de NADH/NADPH oxidases, levando à hiperplasia e hipertrofia da célula muscular lisa, justificando alterações vasculares e da parede dos vasos em pacientes diabéticos. No entanto, não observamos diferença na expressão do gene *AT-1* entre os grupos estudados, sugerindo que a MEC e essas alterações em pacientes diabéticos, estão ligadas à expressão de RAGE. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de os dois grupos estudados apresentarem processo inflamatório ativo e as amostras de tecido cutâneo serem provenientes de amputação de membros inferiores. Porém, é fato que estudos têm demonstrado que a angiotensina II atua como potente agente pró-inflamatório, modulando respostas como quimiotaxia, proliferação e diferenciação de monócitos em macrófagos, por meio do aumento da expressão de moléculas de adesão e citocinas. A angiotensina II induz a adesão de monócitos e neutrófilos às células endoteliais (Kim et al., 1996; Verma et al., 2021).

Em ratos knockout para apolipoproteína E, a infusão de angiotensina II causa patologia vascular caracterizada por aterosclerose e aneurisma na ausência de hipertensão, mas dependente de um estado hiperglicêmico, mostrando que os efeitos da angiotensina II podem ser diretos e independentes de alterações da pressão arterial. A possível hipótese é que a angiotensina II promove uma reação inflamatória na parede vascular pela ativação de vários tipos de células. Provavelmente, os efeitos inflamatórios desse hormônio são mediados pela ativação do fator nuclear κB (NF- κB), que induz a expressão de mediadores pró-inflamatórias, como IL-6, VCAM-1 e MCP-1 (Ruiz-Ortega et al., 2001).

Esses mecanismos vasculares afetam diretamente a renovação das proteínas que compõem esse sistema, como o colágeno e as fibras elásticas, principais componentes da matriz extracelular do tecido cutâneo, por meio da liberação de MMPs. As MMPs são uma família de endoproteases dependentes de zinco com múltiplas funções na remodelação de tecidos e degradação de várias proteínas na MEC. As MMPs também podem afetar moléculas bioativas na superfície celular e modular várias vias celulares e de sinalização. Incluídas nesta família de proteínas estão as collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13) e gelatinases (MMP-2, MMP-9). Algumas MMPs têm atividade elastolítica, como MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12 e MMP-13, mas a MMP-9 também degrada microfibrilas associadas à elastina. Além disso, a exposição de pele humana jovem, protegida do sol, a MMP-1 humana purificada em cultura de órgãos de pele humana causa fragmentação do colágeno e alterações na estrutura e

organização das fibrilas de colágeno na derme, que se assemelham às observadas na pele envelhecida (Cui et al., 2017).

A MMP-1 é a principal protease capaz de iniciar a fragmentação do colágeno fibrilar nativo, predominantemente Col I e III. A MMP-1 cliva as fibrilas de colágeno em um único local dentro de sua tripla hélice central. Uma vez clivado pela MMP-1, o colágeno pode ser degradado por outras MMPs (Brennan et al., 2003). Porém, em nossos resultados, não encontramos diferença significativa nos genes *MMP-1* e *MMP-2* na pele entre de pacientes diabéticos e não diabéticos. Esses resultados podem ser explicados pelo fato dos grupos de pacientes estudados apresentarem lesão vascular e intenso processo inflamatório, o que resultou em aumento da síntese de enzimas responsáveis pela renovação dos componentes da matriz extracelular, como colágeno, proteoglicanos, fibras do sistema elástico e glicoproteínas (Fisher et al., 2009).

Na MEC as proteínas de meia-vida longa permanecem por um período mais longo expostas às altas concentrações de AGEs, tornando-as mais suscetíveis à glicação. O sistema elástico é composto por fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas que são diferenciadas ultra-estruturalmente pela quantidade de elastina. Assim, as fibras oxitalânicas são compostas basicamente por fibrilina, e as fibras elaunínicas e elásticas apresentam, respectivamente, quantidades crescentes de elastina (Sherratt, 2009). Em nosso estudo, a coloração diferencial com Resorcina-Fucsina oxidada e não oxidada mostrou que a pele dos pacientes diabéticos apresenta grande diminuição das fibras elásticas oxidadas (elaunínicas) e não oxidadas (oxitalânicas), tanto na DP quanto na DR. Aliado a esses dados, observamos uma diminuição da expressão de elastina e fibrilina, mas com aparecimento de pequenos grumos, na pele de pacientes diabéticos em relação aos não diabéticos. Todos esses dados sugerem que as proteínas do sistema elástico da pele de pacientes diabéticos sofrem a dupla ação das MMPs e da glicação. Dentre essas proteínas, destaca-se a elastina, uma das proteínas de vida mais longa em vertebrados, que, embora represente 2% do conteúdo da pele, é altamente suscetível à glicação (Schmelzer and Duca, 2021; Uitto, 1986; Yonei et al., 2015). Vale ressaltar que a elastina apresenta grande quantidade do aminoácido lisina, que é suscetível a sofrer glicação. Consequentemente, a glicação da elastina leva à redução da elasticidade ou ao afrouxamento da pele (Yonei et al., 2015). Além disso, combinada com uma perda significativa de elastina em toda a derme, a pele de pacientes diabéticos apresentou uma distribuição alterada dessa proteína, formando pequenos grumos na DP. Nossos achados corroboram com estudos anteriores mostrando pequenos grumos de elastina na derme papilar, cuja frequência e tamanho aumentam com a profundidade da camada

epidérmica na matriz cutânea e ao redor de feridas crônicas de úlceras de pé diabético (Sutcliffe et al., 2017).

Encontramos diminuição do depósito de fibrilina na pele diabética e, além disso, a expressão gênica de *FBN-1* correlacionou-se com a expressão gênica de *MMP-2*. Na verdade, foi descrito que a fibrilina-1 é bastante suscetível a sofrer degradação enzimática (Thomson et al., 2019). Uma redução da fibrilina também foi observada em peles envelhecidas e danificadas pelo foto-envelhecimento (Thomson et al., 2019). Em nosso estudo, essa diminuição de fibrilina encontrada na pele diabética, concomitante ao aumento da expressão gênica de *FBN-1*, sugere uma tentativa de recuperação da rede de microfibrilas de fibrilina. De fato, as microfibrilas de fibrilina desempenham papéis bioquímicos importantes, como a ancoragem das células à matriz e a interação com vários componentes da MEC; assim, a alteração destas microfibrilas, possivelmente resulta em fragilidade da pele em pacientes diabéticos (Eckersley et al., 2020; Thomson et al., 2019).

Na pele do paciente diabético, a rede de colágeno também sofre a dupla ação da glicação e das MMPs. Porém, embora não tenhamos observado diferença na síntese das MMPs, os dados morfológicos e morfométricos mostraram intensa diminuição do Col I nos pequenos vasos da DP e DR na pele de pacientes com DM. Esses dados associados ao aumento da expressão gênica de *COL1A1* sugerem a fragmentação do Col I pela glicação, presente na pele de pacientes diabéticos em comparação com não diabéticos. Esse achado coincidiu com o espessamento da parede vascular, que criou uma faixa periférica da membrana basal com a fusão das fibrilas de colágeno e aumento do Col IV na pele de diabéticos.

Em nosso estudo, apesar do espessamento vascular na pele dos pacientes diabéticos, não encontramos diferença na quantidade de Col III e na expressão do gene *COL3A1*. Esses resultados podem ser explicados pela presença de lesão grave que ocorre em pacientes com comprometimento vascular, processo inflamatório intenso que aumenta o *turnover* do colágeno das paredes dos vasos, em decorrência do aumento da glicemia e dos AGEs. Nossos resultados corroboram com (Argyropoulos et al., 2016) que também não observaram diferença na expressão do gene *COL3A1* em pele de diabéticos.

Em relação ao Col V, nossos resultados de imunofluorescência indicam que não houve diferença na expressão dessa proteína na pele de pacientes diabéticos, quando comparados com não diabéticos. Por outro lado, os genes *COL5A1* e *COL5A2* estavam aumentados na pele dos diabéticos. Provavelmente, não encontramos diferença na

expressão dessa proteína, por se tratar de um grupo de pacientes com comprometimento vascular e pelo fato do colágeno estar sendo sintetizado ao mesmo tempo, devido ao aumento da cascata iniciada pela glicação, que ativa o processo inflamatório e consequentemente a produção de MMPs. O aumento da síntese dos genes *COL5A1* e *COL5A2* são de grande importância, uma vez que esse colágeno possui funções únicas, que vão desde a regulação do diâmetro das fibrilas heterotípicas do Col I/III até a proliferação, adesão celular e imunogenicidade. Além disso, em camundongos transgênicos foi demonstrado que a expressão da isoforma homotrímera [$\alpha 1(V)_3$] do Col V aumentou na JDE, resultando em alterações biomecânicas da pele. Esta isoforma homotrímera de Col V liga-se diretamente às redes contendo Col IV e aos filamentos de Col VI e, portanto, faz parte da rede estrutural que se une a membrana basal à MEC (Bonod-Bidaud et al., 2012).

Interessante salientar que exatamente na JDE observamos uma maior expressão do Col VI, provavelmente em substituição a diminuição de fibrilina. Na verdade, está bem estabelecido que o Col VI e a fibrilina têm funções semelhantes, relacionadas à bioquímica da matriz e às interações com células e outras moléculas de MEC (Eckersley et al., 2020; Thomson et al., 2019). Por outro lado, foi estabelecido que a fibrilina e o Col VI apresentam comportamentos distintos durante o foto-envelhecimento da pele. Desta forma, uma diminuição na fibrilina na JDE pode ser devido, em parte, ao acúmulo de danos moleculares e susceptibilidade à digestão mediada por proteases (Hibbert et al., 2019; Watson et al., 1999). Por outro lado, foi mostrado que as cadeias alfa, constituintes das microfibrilas de Col VI, mantêm a estrutura tridimensional em esferas, que são resistentes ao remodelamento da arquitetura na pele foto-envelhecida (Cescon et al., 2015; Eckersley et al., 2020). Em relação à pele diabética, acreditamos que embora o Col VI possa sofrer glicação, essa proteína é mais resistente à ação das MMPs do que a fibrilina. No entanto, esse descompasso entre a composição do Col VI e da fibrilina na região da DP pode ser responsável pela fragilização da pele e alterações na biomecânica da pele dos pacientes diabéticos.

Em amostras de pele de adultos, o Col VI mostrou-se presente em toda a derme, mais proeminentemente na DP e ao redor da vasculatura (Theocharidis et al., 2016). Embora o Col VI seja particularmente abundante na membrana basal da JDE, sua maior expressão na pele diabética também pode estar relacionada à hiperglicemia (Gara et al., 2011; Keene et al., 1988). Esta hipótese é apoiada pelo fato de que, uma alta concentração de glicose *in vitro* aumentou os níveis de expressão do mRNA para todas as três cadeias de Col VI (Muona et al., 1993). Além disso, a intensa síntese de Col VI

foi associada a fibrose renal e doença renal crônica e é um fator de risco comum no DM2 (Nerlich et al., 1994). Ainda, o aumento da frequência do nível sérico do marcador de formação de Col VI (PRO-C6) foi associado ao aumento da rigidez arterial, eventos cardiovasculares e progressão da doença em DM (Frimodt-Møller et al., 2019; Rasmussen et al., 2018).

Estudos anteriores sugerem que o Col V pode desempenhar um papel importante na cicatrização de feridas e na regeneração de tecidos, uma vez que este colágeno tem participação fundamental na construção e composição da arquitetura da matriz dérmica, além disso, influencia o comportamento dos fibroblastos (Theocharidis et al., 2016). Importante ressaltar que, até o momento, somente nosso estudo tentou elucidar a expressão do Col VI na pele de pacientes diabéticos e sua relação com outras proteínas da pele. Ainda, a pele de pacientes não diabéticos apresentou correlação positiva na expressão gênica entre *COL6A3/FBN-1* e *COL6A3/COL1A1*. Essa correlação do Col VI com a fibrilina e o Col I, que são proteínas primordiais na integridade da pele, provavelmente contribui para a manutenção da integridade da pele em pacientes não diabéticos, principalmente na DP. Por outro lado, na pele de pacientes diabéticos, acreditamos que o aumento da expressão dos genes *COL1A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *COL6A3* e *FBN-1* e a correlação positiva entre *COL6A3/COL5A1* e *COL6A3/COL5A2* é uma tentativa da pele de diabéticos para restaurar a arquitetura da MEC. De fato, observamos que a hiperglicemia impactou a MEC da pele de diabéticos de várias maneiras, incluindo aumento na expressão de RAGE, diminuição do Col I e das fibras elásticas, em especial a fibrilina, e por outro lado, aumentando a expressão do Col VI. Outro aspecto a ser mencionado é o fato de a glicação causar alterações no comportamento dos fibroblastos dérmicos (Guillon et al., 2021). Em um modelo de cicatrização de feridas, o excesso de glicação, resultou no acúmulo de gotículas de lipídios nos fibroblastos, e estes apresentaram capacidade proliferativa e migratória danificada (Guillon et al., 2021). Curiosamente, em nosso estudo, a maior expressão de vimentina, uma proteína estrutural dos fibroblastos, visualizada pela dupla imunolocalização, parece acompanhar a expressão do Col VI na pele de pacientes diabéticos. Isso corrobora com a ideia, de que além da ação da glicação o Col VI também tem um papel no comportamento dos fibroblastos (Theocharidis et al., 2016).

Além disso, na pele de diabéticos, observamos espessamento da EP com hiperplasia dos queratinócitos e alongamento dos cones epiteliais, com concomitante aumento da expressão de citoqueratina e E-caderina. Certamente, essa alteração na histomorfologia cutânea e na expressão de proteínas dificulta a cicatrização cutânea de

pacientes diabéticos, impactando na transição epitélio-mesenquima. Além disso, os fibroblastos demonstram uma alteração fenotípica, bem como diminuição da migração e proliferação. Está bem determinado que a reepitelização por queratinócitos na fase de proliferação é uma etapa chave na cicatrização de feridas. Durante a reepitelização, os queratinócitos das margens migram para o topo do tecido de granulação subjacente, unindo-se finalmente os queratinócitos da margem oposta para fechar lesão (Kashgari et al., 2021). Foi demonstrado que a hiperglicemia em pacientes diabéticos altera a expressão de uma série de fatores que impactam na reepitelização da ferida. Por exemplo, a E-caderina, uma proteína de adesão de queratinócitos, tem sua expressão aumentada pela ação da ZEB1 (Zinc finger E-box binding homeobox), que é um potente ativador da transição epitélio-mesenquima. Ainda mostrou que em condições hiperglicêmicas, ZEB1 perdeu sua capacidade de se ligar ao promotor da E-caderina, então a E-caderina ligada aos queratinócitos, assim regulada positivamente, resistiu à transição epitélio-mesenquima necessária para a cicatrização de feridas. (Singh et al., 2019).

Em nosso estudo, a pele íntegra de pacientes diabéticos apresentou aumento da imunomarcagem de E-caderina, em comparação com a pele de pacientes não diabéticos, sugerindo um fator predisponente para dificultar a reepitelização e cicatrização de feridas. Além disso, outra proteína envolvida na migração dos queratinócitos epidérmicos é a fibrilina. Em um modelo de cicatrização de feridas, foi verificado que o aumento da migração de queratinócitos epidérmicos humanos foi atenuada pela regulação positiva de *FBN-1* (Han et al., 2021). Nossos resultados mostram que o aumento da expressão do gene *FBN-1* e a diminuição da fibrilina na matriz cutânea de pacientes diabéticos, sugere que esta proteína poderia ser um fator predisponente ao retardo da cicatrização nestes pacientes.

Em síntese, nossos dados mostraram que a hiperglicemia aumenta a expressão de RAGE, alteram as fibras elásticas, principalmente a fibrilina, bem como o conteúdo e distribuição do Col VI, refletindo na proliferação epitelial, caracterizada pela expressão alterada da E-caderina e da citoqueratina. Ainda este perfil matricelular e a compreensão desse processo, pode ser de grande auxílio para avaliar a tendência de cicatrização na pele em pacientes diabéticos.

CONCLUSÕES

1. O aumento da expressão de RAGE nos vasos e na matriz cutânea está relacionado com as alterações epiteliais e dos componentes da matriz da DR no grupo diabético
2. O aumento de Col VI e a diminuição de fibras do sistema elástico, predominantemente fibrilina na DP, indica um perfil alterado de proteínas da matriz cutânea, responsáveis pelo grau de fragilidade da pele no DM
3. A distribuição e o aumento do Col VI interferem na proliferação e estrutura epitelial, alterando a expressão de E-caderina e de citoqueratina no DM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aamodt JM, Grainger DW. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials* 2016;86.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.003>.

Ahmed KA, Muniandy S, Ismail IS. N ϵ -(Carboxymethyl)lysine and coronary atherosclerosis-associated low density lipoprotein abnormalities in type 2 diabetes: Current status. *J Clin Biochem Nutr* 2009;44:14–27. <https://doi.org/10.3164/jcbn.08-190>.

Argyropoulos AJ, Robichaud P, Balimunkwe RM, Fisher GJ, Hammerberg C, Yan Y, et al. Alterations of dermal connective tissue collagen in diabetes: Molecular basis of aged-appearing skin. *PLoS One* 2016;11:1–17.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153806>.

Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA, et al. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: Implications for connective tissue remodelling. *Biochem J* 1999;340. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3400171>.

Atayde SA, Yoshinari NH, Nascimento DP, Catanozi S, Andrade PC, Velosa APP, et al. Experimental diabetes modulates collagen remodelling of joints in rats. *Histol Histopathol* 2012;27:1471–9. <https://doi.org/10.14670/HH-27.1471>.

Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Adv Ther* 2014;31:817–36.

<https://doi.org/10.1007/s12325-014-0140-x>.

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 cell adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products. *Arterioscler Thromb Vasc*

Biol 2005;25:1401–7. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000167522.48370.5e>.

Bax D V, Bernard SE, Lomas A, Morgan A, Humphries J, Shuttleworth CA, et al. Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J BiolChem* 2003;278.

Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: Interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci* 1990.

Bonod-Bidaud C, Roulet M, Hansen U, Elsheikh A, Malbouyres M, Ricard-Blum S, et al. In Vivo Evidence for a Bridging Role of a Collagen V Subtype at the Epidermis–Dermis Interface. *J Invest Dermatol* 2012;132:1841–9.

<https://doi.org/10.1038/jid.2012.56>.

Boyle JP, Thompson TJ, Gregg EW, Barker LE, Williamson DF. Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: Dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *Popul Health Metr* 2010;8:29.

<https://doi.org/10.1186/1478-7954-8-29>.

Brennan M. Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *J Biol Chem* 1989;264:20947–52.

Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, et al. Matrix Metalloproteinase-1 is the Major Collagenolytic Enzyme Responsible for Collagen Damage in UV-irradiated Human Skin¶. *Photochem Photobiol* 2003;78.

[https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)078<0043:mmitmc>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)078<0043:mmitmc>2.0.co;2).

Busch M, Franke S, Wolf G, Rohde RD, Stein G. Serum levels of the 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* 2008;108:291–7.

<https://doi.org/10.1159/000127838>.

Care D, Suppl SS. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes 2019. *Diabetes Care* 2019;42:S13–28. <https://doi.org/10.2337/dc19-S002>.

Centers for Disease Control and Prevention. National Diabetes Statistics Report: Estimates of Diabetes and its Burden in the United States. US Dep Heal Hum Serv 2017:1–20.

Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P. Collagen VI at a glance. *J Cell Sci* 2015. <https://doi.org/10.1242/jcs.169748>.

Chbinou N, Frenette J. Insulin-dependent diabetes impairs the inflammatory response and delays angiogenesis following Achilles tendon injury. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:952–7. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00536.2003>.

Chen P, Cescon M, Bonaldo P. Lack of Collagen VI Promotes Wound-Induced Hair Growth. *J Invest Dermatol* 2015. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.187>.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2).

Corson GM, Charbonneau NL, Keene DR, Sakai LY. Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. *Genomics* 2004;83. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.08.023>.

Cotta Pereira G, Rodrigo FG, Bittencourt Sampaio S. Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol* 1976;66. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12481882>.

Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix

Metalloproteinases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 147, 2017.

<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>.

D'hondt S, Guillemin B, Syx D, Symoens S, De Rycke R, Vanhoutte L, et al. Type III collagen affects dermal and vascular collagen fibrillogenesis and tissue integrity in a mutant Col3a1 transgenic mouse model. *Matrix Biol* 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.008>.

Daamen WF, Veerkamp JH, van Hest JCM, van Kuppevelt TH. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials* 2007;28.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.025>.

Delacoux F, Fichard A, Geourjon C, Garrone R, Ruggiero F. Molecular features of the collagen V heparin binding site. *J Biol Chem* 1998.

<https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.15069>.

Delgado-Andrade C. Carboxymethyl-lysine: Thirty years of investigation in the field of AGE formation. *Food Funct* 2016. <https://doi.org/10.1039/c5fo00918a>.

Diabetes DOF. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2013;36:67–74. <https://doi.org/10.2337/dc13-S067>.

Dilworth L, Facey A, Omoruyi F. Diabetes mellitus and its metabolic complications: The role of adipose tissues. *Int J Mol Sci* 2021;22.

<https://doi.org/10.3390/ijms22147644>.

Eckersley A, Ozols M, O'Cualain R, Keavill EJ, Foster A, Pilkington S, et al. Proteomic fingerprints of damage in extracellular matrix assemblies. *Matrix Biol Plus* 2020;5:100027. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2020.100027>.

Erratum: Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants (*The Lancet* (2016) 387(10027) (1513–

1530)(S0140673616006188)(10.1016/S0140-6736(16)00618-8)). Lancet 2017;389.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32060-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32060-8).

Faivre L, Gorlin RJ, Wirtz MK, Godfrey M, Dagoneau N, Samples JR, et al. In frame fibrillin-1 gene deletion in autosomal dominant Weill-Marchesani syndrome. J Med Genet 2003;40. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.1.34>.

Faria A, Persaud SJ. Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. Pharmacol Ther 2017;172. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.11.013>.

Finnis ML, Gibson MA. Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) binds to the pepsin- resistant domain of the $\alpha 3(\text{VI})$ chain of type VI collagen. J Biol Chem 1997;272. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.36.22817>.

Fisher GJ, Quan T, Purohit T, Shao Y, Moon KC, He T, et al. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. Am J Pathol 2009;174. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080599>.

Frimodt-Møller M, Hansen TW, Rasmussen DGK, Theilade S, Nielsen SH, Karsdal MA, et al. A marker of type VI collagen formation (PRO-C6) is associated with higher arterial stiffness in type 1 diabetes. Acta Diabetol 2019;56:711–2. <https://doi.org/10.1007/s00592-019-01306-9>.

Gara SK, Grumati P, Squarzone S, Sabatelli P, Urciuolo A, Bonaldo P, et al. Differential and restricted expression of novel collagen VI chains in mouse. Matrix Biol 2011. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.03.006>.

Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev 2003;55:1531–46. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>.

Grzela T, Krejner A, Litwiniuk M. Matrix metalloproteinases in the wound microenvironment: therapeutic perspectives. Chronic Wound Care Manag Res 2016;29.

<https://doi.org/10.2147/CWCMR.S73819>.

Guillon C, Ferraro S, Clement S, Bouschbacher M, Sigaud-Roussel D, Bonod C. Glycation by glyoxal leads to profound changes in the behavior of dermal fibroblasts. *BMJ Open Diabetes Res Care* 2021;9:1–11. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2020-002091>.

Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1988.tb00954.x>.

Han D, Liu W, Li G, Liu L. Circ_PRKDC knockdown promotes skin wound healing by enhancing keratinocyte migration via miR-31/FBN1 axis. *J Mol Histol* 2021;52:681–91. <https://doi.org/10.1007/s10735-021-09996-8>.

Hibbert SA, Watson REB, Griffiths CEM, Gibbs NK, Sherratt MJ. Selective proteolysis by matrix metalloproteinases of photo-oxidised dermal extracellular matrix proteins. *Cell Signal* 2019;54. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.024>.

Holmes C, Wrobel JS, Maceachern MP, Boles BR. Collagen-based wound dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: A systematic review. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* 2013;6:17–29. <https://doi.org/10.2147/dmso.s36024>.

Jansen KA, Licup AJ, Sharma A, Rens R, MacKintosh FC, Koenderink GH. The Role of Network Architecture in Collagen Mechanics. *Biophys J* 2018;114:2665–78. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.04.043>.

Jiang D, Scharffetter-Kochanek K. Mesenchymal Stem Cells Adaptively Respond to Environmental Cues Thereby Improving Granulation Tissue Formation and Wound Healing. *Front Cell Dev Biol* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00697>.

Jo H, Brito S, Kwak BM, Park S, Lee MG, Bin BH. Applications of mesenchymal stem cells in skin regeneration and rejuvenation. *Int J Mol Sci* 2021;22.

<https://doi.org/10.3390/ijms22052410>.

Jovanovic J, Takagi J, Choulier L, Abrescia NGA, Stuart DI, Van Der Merwe PA, et al. $\alpha V\beta 6$ is a novel receptor for human fibrillin-1: Comparative studies of molecular determinants underlying integrin-RGD affinity and specificity. *J Biol Chem* 2007;282.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M607008200>.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *Histologia Básica: texto e atlas*. 2013.

Karsdal MA, Nielsen SH, Leeming DJ, Langholm LL, Nielsen MJ, Manon-Jensen T, et al. The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. *Adv Drug Deliv Rev* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.014>.

Kashgari G, Venkatesh S, Refuerzo S, Pham B, Bayat A, Klein RH, et al. GRHL3 activates FSCN1 to relax cell-cell adhesions between migrating keratinocytes during wound reepithelialization. *JCI Insight* 2021;6.

<https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.142577>.

Keene DR, Engvall E, Glanville RW. Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J Cell Biol* 1988;107. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.5.1995>.

Keene DR, Sakai LY, Bachinger HP, Burgerson RE. Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter. *J Cell Biol* 1987.

<https://doi.org/10.1083/jcb.105.5.2393>.

Kellar RS, Diller RB, Tabor AJ, Dominguez DD, Audet RG, Bardsley TA, et al.

Improved wound closure rates and mechanical properties resembling native skin in murine diabetic wounds treated with a tropoelastin and collagen wound healing device.

J Diabetes Clin Res 2020;2. <https://doi.org/10.1101/2020.10.01.322636>.

Kielty CM, Sherratt MJ, Marson A, Baldock C. Fibrillin microfibrils. *Adv Protein Chem* 2005;70. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70012-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70012-7).

Kielty CM, Wess TJ, Haston L, Ashworth JL, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Fibrillin-rich microfibrils: Elastic biopolymers of the extracellular matrix. *J Muscle Res Cell Motil* 2002;23. <https://doi.org/10.1023/A:1023479010889>.

Kim JA, Berliner JA, Nadler JL. Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1441>.

Landsman A, Taft D, Riemer K. The Role of Collagen Bioscaffolds, Foamed Collagen, and Living Skin Equivalents in Wound Healing. *Clin Podiatr Med Surg* 2009;26:525–33. <https://doi.org/10.1016/j.cpm.2009.08.012>.

Lettmann S, Bloch W, Maaß T, Niehoff A, Schulz JN, Eckes B, et al. Col6a1 null mice as a model to study skin phenotypes in patients with collagen VI related myopathies: Expression of classical and novel collagen VI variants during wound healing. *PLoS One* 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105686>.

Linsenmayer TF, Gibney E, Igoe F, Gordon MK, Fitch JM, Fessler LI, et al. Type V collagen: Molecular structure and fibrillar organization of the chicken $\alpha 1(V)$ NH₂-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J Cell Biol* 1993. <https://doi.org/10.1083/jcb.121.5.1181>.

Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* 2002;45:1011–6. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-0868-8>.

- Lönnqvist L, Reinhardt D, Sakai L, Peltonen L. Evidence for furin-type activity-mediated C-terminal processing of profibrillin-1 and interference in the processing by certain mutations. *Hum Mol Genet* 1998;7. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.13.2039>.
- Mak KM, Png CYM, Lee DJ. Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *Anat Rec* 2016;299:613–29. <https://doi.org/10.1002/ar.23330>.
- Maraschin J de F, Murussi N, Witter V, Silveiro SP. Classificação do diabetes mellitos. *Arq Bras Cardiol* 2010;95:40–6. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010001200025>.
- Marcos-Garcés V, Molina Aguilar P, Bea Serrano C, García Bustos V, Benavent Seguí J, Ferrández Izquierdo A, et al. Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing - a morphometric and comparative study. *J Anat* 2014;225:98–108. <https://doi.org/10.1111/joa.12186>.
- Marder K, Keller E, Schuppan D. Circulating type VI collagen and undulin, in patients with kidney diseases, after kidney transplantation and on hemodialysis. *Clin Nephrol* 1995.
- Meurer M, Stumvoll M, Szeimies RM. [Skin changes in diabetes mellitus]. [Review] [31 refs] [German]. *Hautarzt* 2004.
- Meyer M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomed Eng Online* 2019;18:24. <https://doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>.
- Michalak M, Pierzak M, Kręcis B, Suliga E. Bioactive compounds for skin health: A review. *Nutrients* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/nu13010203>.
- Milewicz DM, Grossfield J, Cao SN, Kielty C, Covitz W, Jewett T. A mutation in FBN1 disrupts profibrillin processing and results in isolated skeletal features of the Marfan syndrome. *J Clin Invest* 1995;95. <https://doi.org/10.1172/JCI117930>.
- Milewicz DM, Urbán Z, Boyd C. Genetic disorders of the elastic fiber system. *Matrix*

Biol 2000;19. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00099-8](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00099-8).

Miranda-Nieves D, Chaikof EL. Collagen and Elastin Biomaterials for the Fabrication of Engineered Living Tissues. *ACS Biomater Sci Eng* 2017;3.

<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00250>.

Mishra SC, Chhatbar KC, Kashikar A, Mehndiratta A. Diabetic foot. *BMJ* 2017;359.

<https://doi.org/10.1136/bmj.j5064>.

Muona P, Jaakkola S, Zhang RZ, Pan TC, Pelliniemi L, Risteli L, et al. Hyperglycemic glucose concentrations up-regulate the expression of type VI collagen in vitro:

Relevance to alterations of peripheral nerves in diabetes mellitus. *Am J Pathol*

1993;142:1586–97.

Nerlich AG, Schleicher ED, Wiest I, Specks U, Timpl R. Immunohistochemical localization of collagen VI in diabetic glomeruli. *Kidney Int* 1994.

<https://doi.org/10.1038/ki.1994.216>.

Le Pape A, Muh JP, Bailey AJ. Characterization of N-glycosylated type I collagen in streptozotocin-induced diabetes. *Biochem J* 1981;197:405–12.

<https://doi.org/10.1042/bj1970405>.

Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomed Pharmacother* 2019;112:108615. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108615>.

Pérez-Sánchez A, Barrajon-Catalán E, Herranz-López M, Micol V. Nutraceuticals for skin care: A comprehensive review of human clinical studies. *Nutrients* 2018;10.

<https://doi.org/10.3390/nu10040403>.

Pozzilli P, Di Mario U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes off the adult): Definition, characterization, and potential

prevention. *Diabetes Care* 2001;24. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.8.1460>.

R. Gary Sibbald, Woo KY. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes.

Diabetes Metab Res Rev 2008;24:25–30. <https://doi.org/10.1002/dmrr.847>.

Rasmussen DGK, Hansen TW, Von Scholten BJ, Nielsen SH, Reinhard H, Parving HH, et al. Higher collagen VI formation is associated with all-cause mortality in patients

with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Diabetes Care*, 2018.

<https://doi.org/10.2337/dc17-2392>.

Reinhardt DP, Sasaki T, Dzamba BJ, Keene DR, Chu ML, Göhring W, et al. Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *J Biol Chem* 1996;271.

<https://doi.org/10.1074/jbc.271.32.19489>.

Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:1–19.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.

Ricard-Blum S, Beraud M, Raynal N, Farndale RW, Ruggiero F. Structural requirements for heparin/heparan sulfate binding to type V collagen. *J Biol Chem*

2006;281:25195–204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603096200>.

Rodgers UR, Weiss AS. Cellular interactions with elastin. *Pathol Biol* 2005;53.

<https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.022>.

Rodríguez Cabello JC, De Torre IG, Cipriani F, Poocha L. Elastin-like materials for tissue regeneration and repair. *Pept. Proteins as Biomater. Tissue Regen. Repair*, 2018.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100803-4.00012-7>.

Rojas A, Añazco C, González I, Araya P. Extracellular matrix glycation and receptor for advanced glycation end-products activation: A missing piece in the puzzle of the

association between diabetes and cancer. *Carcinogenesis* 2018.

<https://doi.org/10.1093/carcin/bgy012>.

Ruggiero F, Champlaud MF, Garrone R, Aumailley M. Interactions between cells and collagen V molecules or single chains involve distinct mechanisms. *Exp Cell Res* 1994. <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1032>.

Ruggiero F, Comte J, Cabañas C, Garrone R. Structural requirements for $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrin mediated cell adhesion to collagen V. *J Cell Sci* 1996.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10. <https://doi.org/10.1097/00041552-200105000-00005>.

Sabatelli P, Gara SK, Grumati P, Urciuolo A, Gualandi F, Curci R, et al. Expression of the collagen VI $\alpha 5$ and $\alpha 6$ Chains in normal human skin and in skin of patients with collagen VI-related myopathies. *J Invest Dermatol* 2011. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.284>.

Salazar J, Navarro C, Ortega Á, Nava M, Morillo D, Torres W, et al. Advanced glycation end products: New clinical and molecular perspectives. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147236>.

Schmelzer CEH, Duca L. Elastic fibers: formation, function, and fate during aging and disease. *FEBS J* 2021. <https://doi.org/10.1111/febs.15899>.

Sherratt MJ. Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age (Omaha)* 2009;31. <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9103-6>.

Singh K, Sinha M, Pal D, Tabasum S, Gnyawali SC, Khona D, et al. Cutaneous epithelial to mesenchymal transition activator ZEB1 regulates wound angiogenesis and closure in a glycemic status–dependent manner. *Diabetes* 2019;68:2175–90. <https://doi.org/10.2337/db19-0202>.

Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, et al. The

Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv Mater* 2019;31. <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>.

Suh Y, Moon J, Yoon JY, Kim SW, Choi YS. Effects of initiation time of glycemic control on skin collagen recovery in streptozotocin-induced diabetic rats. *Dermatology* 2018. <https://doi.org/10.1159/000490345>.

Sutcliffe JES, Thrassivoulou C, Serena TE, Madden L, Richards T, Phillips ARJ, et al. Changes in the extracellular matrix surrounding human chronic wounds revealed by 2-photon imaging. *Int Wound J* 2017;14:1225–36. <https://doi.org/10.1111/iwj.12789>.

Tardáguila-García A, García-Morales E, García-Alamino JM, Álvaro-Afonso FJ, Molines-Barroso RJ, Lázaro-Martínez JL. Metalloproteinases in chronic and acute wounds: A systematic review and meta-analysis. *Wound Repair Regen* 2019;27:415–20. <https://doi.org/10.1111/wrr.12717>.

Theocharidis G, Drymoussi Z, Kao AP, Barber AH, Lee DA, Braun KM, et al. Type VI collagen regulates dermal matrix assembly and fibroblast motility. *J Invest Dermatol* 2016. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.352>.

Thomson J, Singh M, Eckersley A, Cain SA, Sherratt MJ, Baldock C. Fibrillin microfibrils and elastic fibre proteins: Functional interactions and extracellular regulation of growth factors. *Semin Cell Dev Biol* 2019;89:109–17. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.07.016>.

Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care* 2016. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0561>.

Uitto J. Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-related alterations in collagen and elastin. *Dermatol Clin* 1986;4. <https://doi.org/10.1016/s0733->

8635(18)30806-4.

Uitto J, Li Q, Urban Z. The complexity of elastic fibre biogenesis in the skin - a perspective to the clinical heterogeneity of cutis laxa. *Exp Dermatol* 2013;22. <https://doi.org/10.1111/exd.12025>.

Verma K, Pant M, Paliwal S, Dwivedi J, Sharma S. An Insight on Multicentric Signaling of Angiotensin II in Cardiovascular system: A Recent Update. *Front Pharmacol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.734917>.

W. Rosolia Teodoro , V. Protoceovich Toledo, S. Catanozi, A. P. Pereira Velosa, A. dos Santos-Filho VC. Fibril and network-forming collagen may influence crosslinked density of skin in diabetic rats. *Virchows Arch* 2016;469:S44. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1997-7>.

Wall SJ, Sampson MJ, Levell N, Murphy G. Elevated matrix metalloproteinase-2 and -3 production from human diabetic dermal fibroblasts. *Br J Dermatol* 2003;149:13–6. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05262.x>.

Wang H, Layton BE, Sastry AM. Nerve collagens from diabetic and nondiabetic Sprague - Dawley and biobreeding rats: An atomic force microscopy study. *Diabetes Metab Res Rev* 2003;19:288–98. <https://doi.org/10.1002/dmrr.372>.

Watson REB, Griffiths CEM, Craven NM, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin. Distribution at the dermal-epidermal junction. *J Invest Dermatol* 1999;112. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00562.x>.

Wen Q, Mithieux SM, Weiss AS. Elastin Biomaterials in Dermal Repair. *Trends Biotechnol* 2020;38. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.08.005>.

Wu Q, Jinde K, Nishina M, Tanabe R, Endoh M, Okada Y, et al. Analysis of prognostic

predictors in idiopathic membranous nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001.

<https://doi.org/10.1053/ajkd.2001.21319>.

Yang P, Feng J, Peng Q, Liu X, Fan Z, Luca M. Advanced Glycation End Products: Potential Mechanism and Therapeutic Target in Cardiovascular Complications under Diabetes. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9570616>.

Yeo GC, Mithieux SM, Weiss AS. The elastin matrix in tissue engineering and regeneration. *Curr Opin Biomed Eng* 2018;6. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2018.02.007>.

Yonei Y, Takabe W, Yagi M. Photoaging and Glycation of Elastin : Effect on Skin. *Glycative Stress Res Off J* 2015;2:182–90.

Zhang H, Hu W, Ramirez F. Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 1995;129. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.4.1165>.

Zhang J, Hu ZC, Chen D, Guo D, Zhu JY, Tang B. Effectiveness and safety of negative-pressure wound therapy for diabetic foot ulcers: a meta-analysis. *Plast Reconstr Surg* 2014;134:141–51. <https://doi.org/10.1097/prs.0000000000000275>.

ANEXO

Caracterização dos pacientes

O anexo 1 mostra as principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos neste estudo. Houve diferença significativa entre as características dos doadores das respectivas amostras de pele das análises histológicas e genéticas. A seguir, na descrição de nossos resultados, vamos nos referir aos pacientes divididos em dois grupos, sendo eles pacientes não diabéticos e diabéticos.

Anexo 1 - Características Clínicas

Nº Paciente	Sem DM	DM	Total
	7 (30,43%)	16 (69,56%)	23 (100%)
Sexo	Masculino 5 (29,41%)	Masculino 12 (70,58%)	17 (100%)
	Feminino 2 (50%)	Feminino 2 (50%)	4 (100%)
Idade	61,33	66,18	64,30(100%)
OAC / OAC + INFECÇÃO / INFECÇÃO	5 / 1 / 1	4 / 8 / 4	23 (100%)
HAS / Não HAS	6(26,08%) / Não 1 (4,34%)	15(65,21%) / Não 1 (4,34%)	23 (100%)
Renal	2 (8,69%)	2 (8,69%)	23 (100%)
Tabagista – Ex-tabagista	8 (34,78%)	8 (34,78%)	23 (100%)
Etilista – Ex-etilista	2 (8,69%)	5 (21,73%)	23 (100%)
Insulino dependente		4 (17,39%)	23 (100%)
Glicemia / Hb	90,8 / 8,63	149,16 / 9,50	23 (100%)
IMC	Magreza < 18,5	2 (8,69%)	0 (%)
	Normal 18,5 e 24,9	3(13,04%)	4 (17,39%)
	Sobrepeso 25,0 e 29,9	2 (8,69%)	5 (21,73%)
	Obesidade 30,0 e 39,9	0 (%)	4 (17,39%)
	Obesidade grave > 40,0	0 (%)	1 (4,34%)