SANDRA APARECIDA ATAYDE

**Estudo da histoarquiteta do colágeno da cartilagem,
ligamentos e sinóvia em modelo experimental de diabetes
*mellitus***

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: Walcy Rosolia
Teodoro

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Atayde, Sandra Aparecida

Estudo da histoarquitetura do colágeno da cartilagem, ligamentos e sinóvia em modelo experimental de diabetes *mellitus* / Sandra Aparecida Atayde. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos.

Orientadora: Walcy Rosolia Teodoro.

Descritores: 1.Colágeno 2.Diabetes *mellitus* experimental 3.Transtornos da articulação

USP/FM/DBD-044/11

Aos meus pais, Otávio Atayde e Aparecida Ramos Atayde, por suas histórias de sucesso na educação dos filhos, diante de todas as adversidades.

Ao meu amado, esposo, Francisco Leôncio da Silva, que me ensinou as prioridades na vida.

Aos meus sobrinhos, Gabriel e Mariana motivo de entusiasmo e alegria de viver.

Aos meus irmãos Sergio Roberto Atayde, Silvana Ramos Atayde e Sonia Maria Ramos Atayde, e meus cunhados Janaína e David pelo incentivo e ajuda nos momentos de ansiedade.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela fé que me mantém viva de modo honesto no trabalho e no estudo.

À Dra. Professora Walcy Rosolia Teodoro, na qualidade de amiga e orientadora, sou inteiramente grata por essa orientação que ultrapassa a tese, bem como o imenso carinho nos momentos de dificuldade. Agradeço, sobretudo, o privilégio de haver trabalhado em um tema para o qual você tanto vem contribuindo com novas perspectivas.

À Dra. Ana Paula Pereira Velosa um agradecimento todo especial por sua constante presença e por sua permanente solicitude em todas as fases do projeto, pela paciência, pela maneira carinhosa de ser. Muito obrigada por sua amizade.

Ao Professor Dr. Natalino Hajime Yoshinari, agradeço as ricas sugestões a esse trabalho, assim como sua compreensão nos passos do meu aprendizado.

À Professora Dra. Eloísa Silva Dutra Bonfá, agradeço pela oportunidade do doutorado e por todos os ensinamentos transmitidos durante a pós graduação.

Devo agradecer também à Professora Dra. Vera Capelozzi, obrigada pelas orientações histopatológicas necessárias para realização deste trabalho.

Ao Dr. Edwin R Parra, agradeço as ricas pelas orientações necessárias para realização deste trabalho.

À Professora Dra. Denise Loureiro Viana, por ter me apresentado direcionado e laboratório de pesquisa experimental, que foi decisivo para o meu crescimento profissional.

Aos pesquisadores Sérgio Catanozi, Antônio Santos Filho, pelos ensinamentos particulares que cada área.

Às secretarias Claudia, Fátima, Marta e Iná, obrigada pelo apoio em todos estes anos de aprendizado.

Às amigas pesquisadoras do laboratório de Matriz extracelular, sempre tão dedicadas. Com certeza, sem essa cumplicidade e carinho teria sido mais difícil. Meu muitíssimo obrigado pelas múltiplas e inestimáveis contribuições. Vocês são lembranças muito felizes de uma época inesquecível.

À todos meus familiares e colegas.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais do diabetes <i>mellitus</i>	1
1. 2. Comprometimento articular no DM	2
1. 3. Matriz Extracelular dos Componentes da Articulação	3
1. 3.1. Colágeno	5
1.3.2. Cartilagem	8
1.3.3. Sinóvia	13
1.3.4. Ligamentos e Tendões	15
1.4. Metaloproteinases e TIMPs	20
1.5. Endotelina	22
2. OBJETIVOS	24
Objetivos gerais e específicos	24
3. MÉTODOS	26
3. 1. Desenvolvimento do modelo experimental	26
3.1.1. Animais	26
3.1.2. Indução do diabetes	26
3.2. Preparação das articulações, tendão calcâneo e ligamentos para microscopia óptica	28
3.3. Avaliação morfométrica dos condrócitos	28

3.4. Quantificação do colágeno total da cartilagem, do tendão e ligamentos nas lâminas coradas pelo picrosirius em analisador de imagem	29
3. 5. Imunofluorescência para os colágenos II e XI na cartilagem articular	29
3.6. Imunofluorescência para os colágenos I, III e V no tendão e ligamentos	31
3.7. Imunofluorescência para os colágenos I, III e V na sinóvia	32
3.8. Imunohistoquímica para metaloproteinase 9 e inibidores de metaloproteinases 1 e 2 na cartilagem articular	33
3.9. Imunohistoquímica para detecção de endotelina-1	34
4. RE SULTADOS	36
4. 1. Características do modelo experimental	36
4. 2. Avaliação morfológica da cartilagem	37
4. 3. Avaliação quantitativa do colágeno da cartilagem articular	39
4. 4. Avaliação morfométrica da cartilagem	39
4. 5. Quantificação da MMP-9 e análise da expressão de TIMP1 e TIMP2	40
4. 6. Análise morfológica da sinóvia	42
4. 7. Avaliação quantitativa do colágeno da sinóvia	44
4. 8. Avaliação da expressão de endotelina-1 nas células endoteliais da sinóvia	
4. 9. Análise morfológica do tendão calcâneo e ligamentos	45
4. 10. Avaliação quantitativa do colágeno do tendão calcâneo e dos ligamentos	50
4. 11. Avaliação dos tipos de colágeno na cartilagem, tendão calcâneo e ligamentos por imunofluorescência	52
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMO

Essa pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar os componentes da matriz extracelular da cartilagem, ligamentos, tendão e sinóvia em modelo experimental de diabetes. Metodologia: Ratos Wistar jovens foram divididos em grupo diabético (DG n = 15) induzido por estreptozotocina (STZ, 35 mg / kg) e grupo controle (CG, n = 15). Foram avaliados o peso, a glicemia e o anticorpo anticarboximetil-lisina plasmática, durante o experimento e após 70 dias da indução. As articulações do joelho, os ligamentos colateral lateral, colateral medial e tendão calcâneo foram isoladas, corados com hematoxilina-eosina e Picrosírius. O teor de colágeno total foi determinado por morfometria. Avaliamos ainda a metaloproteinase 9 e os inibidores de metaloproteinases (TIMP) 1 e 2 da cartilagem articular. Na sinóvia analisamos a expressão de endotelina-1. Os colágenos dos tipos I, III, V nos ligamentos e tecido sinovial e II e XI na cartilagem foram avaliados pela técnica de imunofluorescência. Resultados: Os níveis elevados de glicemia e anticorpo anticarboximetil-lisina plasmática foram observados no GD quando comparado com o CG. O peso final foi menor nos ratos GD do que nos ratos do CG. Avaliação histomorfométrica mostrou uma grande quantidade de fibras colágenas finas fibrilas, mais grossa nos ligamentos e cartilagens da GD ratos, bem como o aumento de colágeno e diminuição da espessura das fibras colágenas finas do tecido sinovial. Houve uma diminuição no proteoglicanos na DG ratos, quando comparados com os ratos do GC. Imunofluorescência demonstrou um aumento de colágeno III e V em ligamentos, colágeno XI em cartilagem, e colágeno I no tecido sinovial de ratos DG comparados com ratos do GC. Conclusão: O diabetes está fortemente relacionado com a remodelação do colágeno e ocorre de formas diferentes nos componentes articulares. Estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de novas terapias correlacionadas com as complicações articulares em pacientes diabéticos.

Descritores: 1. colágeno 2. Diabetes *mellitus* experimental 3. Transtornos da articulação

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the extracellular matrix components in cartilage, ligaments and synovia in experimental model of diabetes. In this way Young *Wistar* rats were divided into diabetic group (DG; n = 15) induced by streptozotocin (STZ; 35 mg/kg) and control group (CG; n=15). Weight, blood glucose and plasmatic anti-carboxymethyllysine were measured 70 days after STZ. Knee joints, patellar, collateral lateral, and collateral medial ligaments were isolated, stained with hematoxylin-eosin and Picrosírius. The total collagen content was determined by morphometry. The types I, III, and V collagens in ligaments and synovial tissue and II and XI in cartilage were evaluated by immunofluorescence. Higher blood glucose levels and plasmatic anti-carboxymethyllysine were observed in DG rats when compared with CG rats. The final weight was lower in DG rats than in CG rats. Histomorphometric evaluation depicted a large quantity of thin collagen fibers over thick fibrils in ligaments and cartilage in DG rats as well as increased thick collagen and decreased thin collagen fibers in synovial tissue. There was a decrease in proteoglycans in DG rats when compared with CG rats. Immunofluorescence demonstrated increases of collagen III and V in ligaments, collagen XI in cartilage and collagen I in synovial tissue of DG rats compared with CG rats. In conclusion diabetes is strongly related with collagen remodeling and occurs differently in joint components. These results may contribute to the development of new therapies correlated with joint complications in diabetic patients.

Descriptors: 1. Collagen 2.Diabetes Mellitus, Experimental 3. Articulation Disorders

1. INTRODUÇÃO

1. 1. Aspectos gerais do diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* (DM) é uma síndrome caracterizada por comprometimento do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, composta por quatro categorias: DM tipo1 (DM1), DM tipo2 (DM2), outros tipos e diabetes gestacional. O DM1 é responsável por aproximadamente 5 a 10% de todos os casos de DM e é subdividido em tipo 1A, 1B e diabetes auto-imune latente do adulto (LADA). Em geral, DM1 surge antes dos 30 anos de idade, mas pode atingir pessoas de todas as faixas etárias. Neste caso há uma destruição das células beta, presentes nas ilhotas de Langerhans do pâncreas, as quais são responsáveis por sintetizar e secretar o hormônio insulina, sendo indispensável a reposição deste hormônio no tratamento de pacientes com DM1. No tipo 1A, a destruição das células beta é de causa autoimune (90% dos casos) e, no DM 1B, não há causa conhecida. O LADA é um tipo de DM1 no qual a destruição autoimune das células beta também acontece, mas é muito mais lenta, além de atingir indivíduos mais velhos (com mais de 30 anos). O DM2 é responsável por mais de 90% dos casos de DM, não tem nenhum componente autoimune e é desencadeado geralmente após os 30 anos em indivíduos com história familiar positiva. (1,2)

Além disso, existem outros tipos de diabetes que têm sua etiologia relacionada a endocrinopatias, doenças do pâncreas exócrino, defeitos

genéticos na ação da insulina, defeitos genéticos da célula beta e medicamentos. (1,2)

Vários mecanismos podem induzir um estado inflamatório crônico e moderado no diabetes, representado pelo aumento das proteínas de fase aguda, podendo resultar em prejuízo da resposta inflamatória e da proliferação celular, retardo da angiogênese e do processo de cicatrização.(3) O aumento crônico da glicemia resulta em desenvolvimento de neuropatias periféricas, disfunções gastrointestinais e renais, imunodeficiências, lesões microvasculares e desordem na reparação de tecidos (pele, intestino e outros), além do menos estudado acometimento articular. Todos os aspectos citados podem resultar em aumento da morbidade ou mortalidade relacionada primariamente com complicações microvasculares ou macrovasculares. (1,3,4)

1. 2. Comprometimento articular no DM

O DM está associado a vários distúrbios osteoarticulares. A incidência de DM e a aumentada expectativa de vida do paciente diabético resultam no aumento da prevalência e da importância clínica das alterações músculo-esqueléticas em indivíduos diabéticos(5). As lesões músculo esqueléticas encontradas nesses pacientes podem ser divididas em três categorias: a) Transtornos que representam complicações intrínsecas do diabetes, tais como limitação da mobilidade articular, b) quiroartropatia diabética ou síndrome da mão rígida; c) doenças com maior incidência entre os

diabéticos, como doença Dupuytren, capsulite do ombro e tenossinovite dos flexores; d) doenças para as quais existe uma possível associação com o diabetes, como osteoartrite e síndrome do túnel do carpo de etiologia ainda desconhecida.(6)

Em relação à diminuição da mobilidade articular no DM, o principal fator que influencia é o aumento da rigidez da cápsula articular, dos ligamentos e dos tendões.(5) Porém, a exata fisiopatologia da maioria dos distúrbios músculo-esqueléticos no DM permanece obscura. Alterações no tecido conjuntivo, vasculopatia, neuropatia ou combinações destes problemas podem ser a base do aumento da incidência de lesões músculo-esqueléticas no DM. (1,3,4,7,8)

Neste estudo serão abordados aspectos relacionados às alterações da matriz extracelular, com ênfase no colágeno, nos principais tecidos articulares em modelo experimental de diabetes, além de aspectos vasculares, através da expressão de endotelina na sinóvia, tecido altamente vascularizado. Visto que a matriz extracelular e vasculopatia em diabéticos englobam uma série de mecanismos complexos, para efeitos didáticos e para melhor compreensão da presente tese, serão descritos apenas os principais tópicos abordados.

1. 3. Matriz Extracelular dos Componentes da Articulação

Os tecidos conjuntivos possuem características específicas e propriedades funcionais que dependem da presença de proteínas da matriz extracelular e suas interações intermoleculares. Estes tecidos são formados por células residentes, como fibroblastos e condrócitos, e transitórias,

incluindo as células do sistema imunológico. A matriz extracelular (MEC) é classicamente dividida em dois componentes principais, denominados fibrilar e fundamental. O fibrilar está representado pelas fibras de colágeno e elásticas e o fundamental pelas proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas adesivas, além de ácido hialurônico, metaloproteases da matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMPs), água de solvatação e minerais. Estes diferentes tipos de moléculas interagem entre si, determinando a organização do conjunto e modulando a função da matriz extracelular como um todo. Além disso, a quantidade relativa de cada um dos componentes varia significativamente em cada tecido conjuntivo em particular e também com a idade. (9)

A MEC fornece o suporte estrutural para os tecidos, além de se constituir de um importante meio, através do qual transitam informações entre as células, participando direta ou indiretamente de uma série de processos que incluem morfogênese, diferenciação e migração celular. As diversas concentrações e associações dos componentes da matriz extracelular resultam em adaptações específicas às necessidades funcionais em cada órgão permitindo a manutenção da homeostase.(10)

Os componentes da MEC dos tecidos articulares, como cartilagem, sinóvia, tendões e ligamentos são fundamentais para o funcionamento destas estruturas, sendo este um aspecto singular que os diferem dos demais tecidos do organismo.(11)

1. 3.1. Colágeno

Dentre os componentes da MEC, o colágeno é uma glicoproteína presente em quase todos os tecidos. Esta proteína é um elemento estrutural que confere resistência ao tecido; entretanto, sabe-se que além da função de suporte, participa na diferenciação, adesão, migração e proliferação celular. Além das funções citadas sabe-se que esta proteína pode exercer atividade antigênica e que esta característica pode variar com a espécie e órgãos. (11,12)

As moléculas de colágeno fibrilar são formadas por três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias α , arrançadas numa conformação de tripla hélice, a qual se estabiliza por pontes de hidrogênio intercadeia, conferindo à molécula alta estabilidade, rigidez e forma de bastão. Cada uma das cadeias de colágeno possui uma sequência de aminoácidos característica, além de uma série de repetições da sequência de aminoácidos Glicina-X-Y, no qual X é frequentemente prolina e Y, hidroxiprolina. As cadeias α possuem sequências adicionais de 15 a 20 aminoácidos que não fazem parte da tríplice hélice e que são denominadas de telopeptídeos, também conhecidos como extensão não colagenosa da molécula. Existem duas extensões, a NH_2 (aminoterminal) e a COOH (carboxiterminal). Há evidências de que o domínio COOH contém informações essenciais para a formação da tríplice hélice, enquanto o NH_2 -terminal apresenta informações importantes para a regulação final do diâmetro das fibrilas. (11)

No processo de biossíntese do colágeno, as células liberam para a matriz extracelular sua forma precursora: o procolágeno. Este apresenta duas grandes extensões propeptídicas: amino (NH₂) e carboxi (COOH) terminal, que após secreção na matriz extracelular são removidos pelas NH₂ e COOH-proteinases. Este processo resulta em uma molécula nativa (tropocolágeno) de tripla hélice com dimensões aproximadas de 300nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, a qual retém telepeptídeos curtos, com poucos aminoácidos. (11,12,13) No processo de fibrilogênese as moléculas de tropocolágeno agregam-se segundo uma orientação cabeça-cauda, formando as fibrilas de colágeno (Figura 1). Estas, quando analisadas por microscopia eletrônica, revelam a presença característica de bandas claras e escuras. Grupos de fibrilas podem associar-se para formar as fibras de colágeno. (12,13) Até o momento, a superfamília dos colágenos engloba vinte e oito diferentes tipos de colágeno e mais de 40 cadeias α geneticamente distintas descritas. (14)

Os diferentes tipos de colágeno foram classificados em grupos de acordo com a sua conformação e propriedades, são eles: colágenos fibrilares (I, II, III, V e X); colágenos associados a fibrilas ou FACIT, com tripla hélice interrompida (IX, XII e XIV); colágenos associados a fibrilas, formando filamentos (VI); colágenos que formam lâminas (IV, VIII e X); colágenos que formam fibrilas de ancoragem (VII); colágenos transmembrana (XIII e XVII) e colágenos conhecidos pelo seu clone do DNA, ainda não isolados em nenhum tecido. (15)

Figura 1- Representação esquemática do arranjo de moléculas de tropocolágeno em estruturas fibrilares e de fibrilas.

Um fato importante em diabetes é que na vigência de hiperglicemia, mudanças na estrutura do colágeno ocorrem por meio de glicação, que se caracteriza pela ligação covalente não enzimática entre a glicose ou outros açúcares redutores e a porção NH_2 -terminal da cadeia polipeptídica e dos resíduos de lisina e arginina. A reação inicial é lenta formando um composto

instável chamado Base de Schiff. A progressão da reação induz a formação dos produtos de glicação ou produtos de Amadori os quais, por meio de rearranjos intra e intermoleculares geram os produtos avançados de glicação (AGE). Os AGE alteram, irreversivelmente, a estrutura primária das proteínas e, conseqüentemente sua função biológica, devido a sua meia vida ser de longa duração. O colágeno é bastante suscetível ao processo de glicação, contribuindo como um importante determinante para as complicações ao longo prazo do DM. A carboximetilisina, o AGE mais estudado no DM, encontra-se invariavelmente em área de lesão onde, por meio de interação com receptores para AGE (RAGE), induz a expressão de mediadores inflamatórios e apoptose celular.(16,17,18)

1. 3.2. Cartilagem

O tecido cartilaginoso apresenta como principal função a de suporte aos tecidos moles, facilitando o deslizamento dos ossos nas articulações e revestindo superfícies articulares; absorvendo os choques. Tais propriedades são provenientes da composição e organização dos componentes mais abundantes da matriz extracelular: os proteoglicanos (proteínas associadas as glicosaminoglicanas), o ácido hialurônico, diversas glicoproteínas e o colágeno .(13)

A matriz extracelular da cartilagem adulta é composta por vários compartimentos, sendo que cada um deles apresenta perfil morfológico e composição bioquímica distintos. O compartimento adjacente à membrana

dos condrócitos (células da cartilagem) é denominado matriz lacunar ou pericelular, sendo caracterizada pela ausência de organização do colágeno fibrilar. Em seguida, situa-se a matriz territorial ou capsular que é composta por uma rede de fibrilas de colágeno interligadas, que garantem suporte aos condrócitos. O último e maior compartimento da cartilagem articular é a matriz interterritorial, a qual contém grande parte das fibras de colágeno e proteoglicanas.(13)

A matriz extracelular encontrada neste tecido é composta basicamente por água, cerca de 65-85% do peso seco do tecido, enquanto que as principais macromoléculas, como o colágeno e os proteoglicanos, representam respectivamente cerca de 10-30% e 5-10% do peso seco do tecido.(19)

A cartilagem articular é formada principalmente pelo colágeno dos tipos II, IX e XI que formam heterotípicas (Figura 2). O colágeno tipo II, pertence à família dos colágenos formadores de fibras, é a mais abundante proteína fibrilar encontrada, constituindo cerca de 80-85% do conteúdo de colágeno do tecido. Este colágeno é homotrímico, ou seja, formado por três cadeias $\alpha 1$ do tipo II idênticas. Por outro lado, o colágeno do tipo IX, da família dos colágenos associados a fibrilas com tripla hélices ininterruptas (FACIT) e o tipo XI, são heterotrímeros formados por três cadeias α diferentes entre si e juntos compõem cerca de 5 à 10% do conteúdo total de colágeno do tecido (19). A função destes tipos de colágeno, associados ao dominante do tipo II, é a de limitar o diâmetro da fibra para aproximadamente 15-30nm, assim como de outras proteínas não colagenosas.

Figura 2- Esquema da estrutura da fibrila fina de colágeno da cartilagem. Os colágenos dos tipos XI/IX/II formam um heteropolímero, através de ligações cruzadas, importante no mecanismo de organização fibrilar. Azul: moléculas de colágeno II; amarelo: moléculas de colágeno tipo XI; vermelho: moléculas de colágeno tipo IX. O domínio N-terminal do colágeno tipo XI (amarelo) tem uma extensão que se projeta das microfibrilas para a superfície.

O colágeno tipo XI retém um domínio globular não tripla hélice (20) e está localizado, em grande parte, dentro da fibrila colágena, ligado ao colágeno tipo II através de ligações cruzadas do tipo aldeído hidroxilisina (Figura 2). (21) Devido às suas características moleculares e localização na fibrila, o tipo XI é fundamental na fibrilogênese, uma vez que regula o diâmetro da fibrila colágena impedindo a adição extra de colágeno tipo II e assim garantindo a formação de fibrilas finas (21,22).

O N-peptídeo da cadeia $\alpha 1$ (XI) representa uma estrutura em comum com aproximadamente 16 α -cadeias de colágeno. Ele contém um domínio

LNS (laminina LG5, neuroxina 1B e o 6º hormônio ligado à globulina) que pode ser um fator importante na estabilização das interações moleculares entre células, entre a célula e a matriz circundante, bem como entre os constituintes moleculares da matriz extracelular. (21)

O modelo estrutural da cadeia $\alpha 1(XI)$ pode servir como uma representação do domínio homólogo em outros tipos de colágeno e fornece detalhes mecânicos sobre o processo de arranjo fibrilar e organização da matriz extracelular, como na família dos FACIT; e nos colágenos quantitativamente menores tipos V e XI que contem o domínio LNS em comum. (21)

Os proteoglicanos têm peso molecular de aproximadamente 2,5 milhões de daltons e são formados por vários elementos organizados numa complexa arquitetura aniônica, com função de mola biológica. Sua unidade básica são os glicosaminoglicanos (GAG), altamente sulfatados, que conferem aos proteoglicanos propriedades hidrofílicas (13). Existem vários tipos de glicosaminoglicanos, porém na cartilagem são encontrados o sulfato de condroitina e o queratam sulfato. Estes são ligados a uma proteína central através de ligações covalentes, formando complexos denominados agregans, os quais se ligam ao ácido hialurônico, através de proteínas de ligação (Figura 3). (13)

Figura 3 - Desenho esquemático da cartilagem normal, destacando a estrutura da cartilagem e organização das macromoléculas presentes no tecido: fibrilas de colágeno II e proteoglicanas. Em detalhe encontra-se a estrutura das grandes proteoglicanas, agregados de agrecan. A estrutura básica do agrecan é formada pelos glicosaminoglicanos, como Sulfato de condroitina e Queratan sulfato, que ligam-se a uma proteína central, formando uma estrutura semelhante a uma escova. Na formação dos agregados os agrecans ligam-se a uma longa molécula de ácido hialurônico, através de uma proteína de ligação. Os glicosaminoglicanos, como o Sulfato de condroitina, têm um grande número de cargas negativas, as quais são responsáveis pelas propriedades hidrofílicas das proteoglicanas.

A presença de água na cartilagem em associação com os proteoglicanos confere ao tecido uma tendência expansiva, devido à pressão osmótica de pró-hidratação, que por sua vez é contida pela grande força de contenção exercida pela malha de fibras de colágeno, criando uma considerável pressão de expansão dentro do tecido (Figura 3). (23) A composição e a complexa organização ultra-estrutural entre o colágeno e os proteoglicanos, é que garante as propriedades inerentes à cartilagem articular, como compressibilidade, elasticidade e auto-lubrificação, que dão a este tecido a resistência necessária para dissipar e amortecer as forças de impacto, ao qual as articulações diartrodiais estão sujeitas, sem muito gasto de energia, visto tratar-se de um tecido não vascularizado.

1. 3.3. Sinóvia

Dentre os componentes articulares a sinóvia é uma importante estrutura que pode estar afetada no DM. A sinóvia consiste de um espaço tecidual modificado, formada pelas células de revestimento da membrana sinovial. A membrana sinovial é um fino revestimento (~50nm em humanos), composto por macrófagos, “fibroblastos-*like*” e capilares fenestrados, que repousam em uma matriz especializada conhecida como íntima e subíntima. A íntima está associada a uma matriz fibrilar fina ou amorfa com fibras de colágeno ausentes ou intermitentes. Esta está apoiada sobre uma camada mais espessa (~100 nm) de tecido conjuntivo frouxo chamado subsinovial que inclui um sistema extensivo dos vasos linfáticos para o apuramento das

moléculas transportadas. Ao lado destas fibras, existe um tecido conjuntivo frouxo relativamente rico em colágeno, bastante distensível, junto aos ligamentos, tendões, periósteo ou outras estruturas fibrosas que permite à membrana movimentar-se livremente. (24)

O líquido sinovial das articulações, normalmente funciona como um lubrificante biológico, bem como um suporte bioquímico através do qual nutrientes e citocinas reguladoras podem atravessar e chegar na superfície articular (Figura 4). As células da membrana sinovial formam uma camada descontínua, separada por espaços intercelulares de diversos microns de largura. A matriz extracelular desse tecido é composta principalmente por colágeno tipo I e menor proporção dos tipos III, IV, V e VI, sulfato de condroitina, proteoglicanos e fibronectina. (25,26)

O acometimento sinovial pode prejudicar a nutrição articular favorecendo diversas alterações na mobilidade e reestruturação da capsula articular.^{8,9,10} Diversos processos podem ser responsáveis por sua modificação como os AGES que se ligam as fibras de colágeno modificando sua estrutura e conseqüentemente sua função, sendo que o grau de glicosilação enzimática está diretamente relacionado com o nível de glicemia, resultando em aumento da rigidez vascular e seu envelhecimento precoce. Este processo pode influenciar na nutrição realizada por este vaso e afetar estruturas dependentes. (27,28)

Figura 4 - (a) As articulações sinoviais são geralmente compostas de cartilagem, sinóvia e fluido sinovial, (b) modeladas pelos compartimentos de comunicação, nos quais fatores químicos e mecânicos regulam a secreção de lubrificante.

1. 3.4. Ligamentos e Tendões

Os tendões e ligamentos são basicamente compostos de células, os fibroblastos, e matriz extracelular, na qual estão imersas proteínas fibrosas de colágeno e elastina, proteoglicanas, glicoproteínas, mucopolissacarídeos e água. O colágeno é o maior componente da matriz extracelular, compreendendo cerca de 86% a 95% do peso úmido do tendão, sendo essencial na mecânica do sistema músculo-esquelético. Estes tecidos têm uma estrutura fibrilar altamente ordenada composta de feixes de proteínas, constituídas predominantemente por fibras de colágeno do tipo I. (13,29)

É descrito que o colágeno I é uma molécula convencionalmente com pouca flexibilidade e alta resistência (30). Porém, nos ligamentos e tendões

a base molecular para a flexibilidade do tipo I, está relacionada com seqüências de aminoácidos, que perdem prolina e hidroxiprolina, aminoácidos que conferem resistência à molécula. Estudos recentes sugerem que as seqüências sem prolina e hidroxiprolina são capazes de formar um anel interno, que conferem a estas regiões mais flexibilidade do que outras regiões da tripla hélice. Esta variação na flexibilidade molecular do colágeno tipo I afeta a organização, bem como as propriedades mecânicas dos tendões. Estudos recentes sugerem que o diâmetro das fibrilas parece ser inversamente proporcional à flexibilidade molecular do colágeno. (30)

Nos tendões e ligamentos, além do colágeno tipo I estão presentes pequenas quantidades de colágeno dos tipos III e V, sugerindo que nestes tecidos as diferenças específicas nas propriedades mecânicas, refletem diferentes proporções destes tipos de colágeno. (30)

Recentemente, foi postulado que a molécula de colágeno do tipo III é mais flexível que a molécula do tipo I, sugerindo que a mistura de diferentes proporções destes colágenos pode alterar a elasticidade das fibras de colágeno. (30)

Estudos têm mostrado que os colágenos tipos I e V podem estar presentes nestes tecidos na forma de heteropolímeros. A formação de misturas de fibrilas heterotípicas fornece um meio de modular a auto-organização e modificação das propriedades mecânicas. A presença de um grande domínio NH₂-terminal no colágeno tipo V altera a organização e deslizamento das moléculas de colágeno durante a deformação mecânica.

Além disso, em similaridade ao demonstrado em estudos realizados em pele, este grande domínio NH₂-terminal da molécula de colágeno V pode regular o diâmetro das fibrilas heterotípicas. (30)

O tendão é uma unidade hierárquica multi estrutural, que contém moléculas de colágeno, fibras, feixes de fibras, fascículos e unidades de tendão que correm de modo paralelo ao eixo geométrico (Figura 5), tendo o colágeno tipo I como o elemento estrutural fundamental na formação das fibrilas. (30)

Em relação a outros tecidos articulares, existe grande número de estudos relacionados ao comprometimento dos tendões e ligamentos em diabetes.

No processo cicatricial do tendão em pacientes diabéticos, assim como em sua recuperação funcional, ocorre degradação intracelular do procolágeno (molécula precursora) e anormalidades morfológicas, podendo estes fatores estar relacionadas ao desenvolvimento de tendinites crônicas.(3)

Os cursos da seqüência e do tempo dos eventos que ocorrem na cicatrização de um tendão assemelham-se àqueles relatados em muitos outros tecidos. Numa lesão de tendão, o diabetes afeta muitas atividades biológicas que são essenciais num processo de cicatrização.(1,2,3,5) O acúmulo de neutrófilos, macrófagos dos tipos ED1⁺ e ED2⁺, angiogênese e a proliferação de novas células diminuem no tendão do diabético, também prejudicando este processo reparativo.

Figura 5 – Estrutura hierárquica do tendão. Diagrama ilustrando a interação entre as moléculas de colágeno, fibrilas, fibras, fascículos e tendão. (30)

Foi demonstrado que o diabetes conduz a mudanças na estrutura do colágeno que se assemelham às que ocorrem no envelhecimento, como aumento da glicosilação não enzimática e ligações cruzadas, sugerindo uma aceleração do processo de envelhecimento normal. (8)

Em pacientes diabéticos, a maior incidência de lesões do tendão pode ser explicada pela organização anormal de redes de colágeno. Além disso, recentemente tem sido proposta nova teoria etiológica para tendinopatia diabética, em que o colágeno teria papel fundamental através da mudança da composição da matriz celular. (3)

Estudos experimentais demonstraram mudanças na solubilidade,

glicosilação não enzimática e aumento das ligações cruzadas do colágeno tipo I nos tendões de ratos diabéticos. A solubilidade foi diminuída e ocorreu aumento no colágeno ácido-insolúvel, também presente na subnutrição de ratos diabéticos levando a um crescimento deficiente. (8) Pelo menos três mecanismos têm sido implicados no aumento da fibrila de colágeno de diabéticos: acúmulo de produtos avançados de glicação, o que altera a formação normal de ligações cruzadas na estrutura terciária e quaternária da proteína; elevação do estresse mecânico que resulta na alta regulação da estrutura dos genes do colágeno; e aumento do acesso à oferta metabólica como a da glicose, que resulta em aumento da expressão dos componentes da membrana. (7,8)

A mudança de solubilidade também pode estar relacionada às ligações cruzadas do colágeno, que aumentam gradualmente com a idade, sugerindo que este fato não contribui significativamente ao rápido aumento do colágeno ácido-insolúvel do tipo I nos tendões de ratos diabéticos. Estas ligações são encontradas normalmente nos tecidos intersticiais entre as moléculas e fibrilas de colágeno. A estabilidade, número e distribuição química das ligações cruzadas determinam a solubilidade e a força tênsil dos tecidos. Resíduos de glicolisina e glico-hidroxilisina, derivados de glicosilação não enzimática, podem formar ligações cruzadas, propondo-se que o aumento das mesmas resulta do processo de glicosilação não enzimática. (14)

Em pacientes (ou ratos) diabéticos, através da análise da glicosilação não enzimática por microscopia eletrônica, foi também demonstrado que ocorre atraso no processo de estruturação do colágeno no tendão. (3,14,31)

1. 4. Metaloproteinases e TIMPs

O processo metabólico dos componentes da articulação é mediado principalmente por enzimas zinco-dependentes, denominadas metaloproteinases (MMP) ou matrixins. Estas enzimas são produzidas pelos condrócitos da cartilagem e células inflamatórias, presentes na membrana sinovial, sendo liberadas na matriz extracelular na forma precursora inativa: as proenzimas. As MMP são ativas a pH neutro e podem digerir sinergicamente todas as macromoléculas de matriz. Existem três grupos de metaloproteinases: as collagenases, as gelatinases e a estromelisina. (32)

As collagenases específicas incluem a MMP-1 (colagenase-1), a MMP-8 (colagenase-2) e a colagenase 3 (MMP-13). Este grupo de enzimas apresenta especificidade para domínios na região helicoidal, dos colágenos intersticiais I, II e III, num sítio específico a três quartos da distância da região N terminal. (32) As gelatinases englobam a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B). Estas enzimas degradam os colágenos tipos IV, V, VII e XI e agem sinergicamente com collagenases para a clivagem de colágenos degradados (gelatins). Além disso, digerem a elastina, agregans e proteínas de ligação da cartilagem. (33)

O subgrupo da estromelisina compreende a MMP-3 e MMP-10, que

degradam os colágenos de membrana basal (colágeno IV), bem como proteoglicanas e glicoproteínas de matriz; além de vários outros componentes da matriz extracelular, incluindo agregam, fibronectina e laminina ⁽²³⁾. O colágeno dos tipos III, IX e X, além dos telopeptídeos dos colágenos I, II e XI são clivados pela MMP-3. (32,33)

Existem outras metaloproteases como: a MMP-7, com potente atividade proteolítica, que digere uma grande variedade de substâncias; a MMP-11, que tem fraca ação proteolítica para fibronectina, laminina, proteoglicanos e colágenos degradados (gelatins); a MMP-12 que digere elastina e MT-MMP, que é encontrada na superfície das células e ativa proMMP-2.(33)

Na degradação da cartilagem articular participam várias metaloproteases, como a MMP-9, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-13 e MT1-MMP (metaloproteinase de membrana tipo 1), encontradas em concentrações diferentes, variando de acordo com o estágio de degeneração do tecido. (33,34)

Os mais importantes inibidores teciduais das metaloproteases são os TIMP1, TIMP2 e TIMP3, os quais se ligam à forma ativa da enzima, formando complexos na proporção de 1:1, e deste modo bloqueando sua atividade. O aumento de metaloproteases juntamente com o decréscimo nos níveis dos TIMPs contribuem para a degradação enzimática dos tecidos articulares. (35)

1. 5. Endotelina

Nas doenças metabólicas, o endotélio tem importante papel na regulação do ambiente vascular e perivascular, mantendo uma superfície não trombótica e regulando a permeabilidade e o tônus vasomotor. Situadas na interface entre sangue e tecido, as células endoteliais estão constantemente expostas a vários agentes e em resposta adquirem propriedades pró-inflamatórias e pró-coagulantes. O endotélio produz peptídeos denominados endotelinas, que são mensageiros químicos dentro do organismo reconhecidos como os vasoconstritores mais potentes e de efeitos mais duradouros. (36)

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

1.9. Modelo experimental de diabetes

A estreptozotocina é um antibiótico derivado N-nitroso da D-glucosamina que foi inicialmente isolado no ano de 1960 a partir de cultura de *Streptomyces achrou*, o efeito diabetogênico dessa droga ocorre devido à lesão seletiva das células beta pancreáticas, que normalmente regulam os níveis de glicose no sangue, produzindo o hormônio insulina. Isto sugeriu o uso da droga como um modelo animal de diabetes e como um tratamento médico para câncer das células beta. Atualmente essa droga tem ampla utilização indução de diabetes experimental. (37,38,39)

A etiologia exata das complicações musculoesqueléticas associadas ao DM permanece desconhecida, há evidências de que a hiperglicemia possa acelerar a glicação não enzimática e a deposição anormal de colágeno. Neste aspecto, nós sugerimos que os altos níveis de glicose nos ratos diabéticos, possam alterar a histoarquitetura das estruturas intra articulares e extra articulares. Para testar essa hipótese, nós investigamos o remodelamento da cartilagem, sinóvia, ligamentos e tendão em modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Uma vez que a limitação de movimento articular envolve habitualmente as pequenas e grandes articulações do paciente diabético e há escassez de estudos da fisiopatologia deste comprometimento, tivemos como objetivo avaliar o remodelamento da matriz extracelular da cartilagem articular, da sinóvia, do tendão calcâneo (TC) e dos ligamentos: colateral lateral (LCL), medial (LCM) e patelar (LP) em modelo experimental de diabetes em ratos. Para o desenvolvimento desta hipótese foram realizados:

Objetivos Específicos:

- Avaliação morfológica dos tendões, ligamentos, tecido cartilaginoso e sinovial no modelo de diabetes induzido pela estreptozotocina, através da coloração de HE, tricrômico de Masson e Picrosírius.
- Quantificação das proteoglicanas da cartilagem articular por análise de Imagem
- Avaliação morfométrica dos condrócitos através de método morfológico esteriológico
- Análise histomorfométrica da quantidade total do colágeno nos tendões, ligamentos, cartilagem e tecido sinovial pela coloração de Picrosírius sob luz polarizada em analisador de imagem.
- Avaliação da distribuição do colágeno dos tipos I, III e V no tecido sinovial, tendões, ligamentos e colágeno dos tipos II e XI na cartilagem articular por imunofluorescência.

- Quantificação da expressão da metaloproteinase MMP-9 por imunohistoquímica através de método morfológico estereológico.
- Análise da morfológica da expressão de TIMP1 e TIMP2 na cartilagem.
- Avaliação da ativação das células endoteliais da sinóvia pela expressão de endotelina-1.

3. MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido após a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa, CAPPesq-1060/06, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3. 1. Desenvolvimento do modelo experimental

3. 1.1. Animais

Ratos Wistar (n=30) com 2,5 meses de idade (peso corporal de 200-250g), foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e divididos em dois grupos: o primeiro foi induzido a desenvolver diabetes (n=15) enquanto o grupo controle recebeu solução fisiológica (n=15). Durante o período de realização dos experimentos, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Clínica Médica, com ciclo de 12h claro/12h escuro, à temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, recebendo água e ração padronizada *ad libitum*.

3.1.2. Indução do diabetes

Com o objetivo de assegurar homogeneidade entre os grupos de ratos, antes do início do experimento, amostras de sangue foram coletadas a partir da veia caudal dos animais, para determinações bioquímicas de glicose do plasma, utilizando aparelho de medir glicemia (An Accu Chek ® Product Advantage – Produtos Roche Químicos Farmacêuticos S/A). Sob

anestesia intraperitoneal de pentobarbital sódico (Hypnol® 60 mg/kg de peso corporal) a indução de diabetes foi realizada mediante a injeção de 35 mg/kg de peso corporal de estreptozotocina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) na veia caudal dos animais.

A estreptozotocina foi diluída em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (Baxter Hospitalar Ltda, SP, Brasil) com pH 7,2 – 7,4 e imediatamente infundida nos ratos.

Ratos não diabéticos foram utilizados como grupo controle, os quais foram submetidos à infusão do mesmo volume de solução fisiológica.

Amostras de sangue foram coletadas após uma semana da infusão, a partir da veia caudal, para a determinação da glicemia (Accu Chek® Product Advantage – Produtos Roche Químicos Farmacêuticos S/A). Os animais foram mantidos 5,5 horas em jejum antes da coleta, com exceção da primeira coleta de sangue que foi feita com os animais mantidos a 12 horas em jejum.

Os animais foram mantidos diabéticos por 10 semanas após a infusão da droga, sem administração de insulina, uma vez que a concentração de estreptozotocina infundida resulta somente em comprometimento parcial da massa de células beta. (38)

O peso corporal dos ratos foi monitorado semanalmente. Ao final, foi realizada a eutanásia dos animais e feita coleta de sangue (5,5 horas em jejum) a fim de avaliar a glicemia final.

3. 2. Preparação das articulações, tendão calcâneo e ligamentos para microscopia óptica

As articulações femorotibiais, tendão calcâneo e ligamentos (LCM, LCL, LP) foram coletados, fixados em formol 10%, descalcificados com ácido nítrico 7% em meio aquoso, durante aproximadamente quatro dias. Após este período, as amostras das articulações foram divididas em duas porções seccionadas perpendicularmente à superfície articular em níveis. De cada uma das porções (medial e lateral), realizou-se 6 cortes com 6µm de espessura com um espaço de 50µm entre eles. Posteriormente, as amostras foram coradas pela hematoxilina-eosina (H&E), para avaliar células inflamatórias em microscópio óptico. Para avaliação do conteúdo de colágeno tecidual as amostras foram coradas pelo Picrosírius, preparado a partir de Sirius red 0,2% em solução saturada de ácido pícrico (Direct Red 80, C. I. 35780, Aldrich, Milwaukee, WI), e analisadas sob luz polarizada (40, 41). Para a avaliação das proteoglicanas da cartilagem as lamínas foram coradas com Safranina-O com “*Fast-green*”.

3. 3. Avaliação morfométrica dos condrócitos

A quantificação histomorfométrica dos condrócitos foi realizada através de método estereológico convencional. (42) Este é um método de contagem de pontos que consiste em um retículo (área: 62.500 µm²) formado por 100 pontos e 50 linhas, cada uma com 25µm de comprimento, adaptada a um microscópio convencional.

3. 4. Quantificação do colágeno total da cartilagem, do tendão e ligamentos nas lâminas coradas pelo picrosírius em analisador de imagem

As lâminas coradas pelo Picrosírius foram analisadas em microscópio óptico equipado com um polarizador de luz, acoplado a um analisador de imagem. O sistema utilizado consiste de uma câmera CCD Sony acoplada a um microscópio *Olympus BX-51*, a partir do qual as imagens puderam ser visualizadas no monitor. Através de um sistema digital inserido num computador (Pentium3 300Mhz), as imagens foram processadas por um *software Image ProPlus 6.0*. Foram selecionados aleatoriamente 10 campos para cada uma das seguintes regiões: superfície articular e profunda do tecido cartilaginoso, região ligamentar e tendínea e sinovia, visualizados sob um aumento de 400 vezes. O colágeno presente nos campos analisados foi medido através da seleção de tonalidades birrefringentes avermelhadas ou alaranjadas e amareladas ou esverdeadas, correspondentes às bandas de colágeno polarizadas de fibras grossas e finas, respectivamente (41). A área do conteúdo de colágeno foi dividida pela área total e o resultado final expresso em porcentagem.

3. 5. Imunofluorescência para os colágenos II e XI na cartilagem articular

Cortes das articulações de aproximadamente 3 micrômetros foram aderidos às lâminas previamente tratadas com aminosilano. Os cortes foram desparafinizados em xilol e re-hidratados com banhos de álcool etílico, com concentrações decrescentes (100% - 75%), água corrente (10 minutos), água destilada e tampão fosfato pH 7,4 (PBS). Posteriormente, foi feita a digestão enzimática com condroitinase ABC 2 UN/ml (*Sigma, St. Louis, MO, EUA*) dissolvida em tampão tris-HCl em acetato 0,05M pH 8,0, por 3 horas à 37°C, seguida de digestão com pepsina bovina (*Sigma, St. Louis, MO, EUA*) em ácido acético 0,5N, durante 30 minutos.

Os cortes tratados foram lavados três vezes por 10 minutos, com PBS e deixados incubando com leite desnatado 5% em PBS, durante 30 minutos. Subsequentemente, as lâminas foram incubadas, por uma noite, com os anticorpos policlonais produzidos em coelho, anti-colágeno II e XI provenientes de traquéia de boi, numa diluição de 1:60 e 1:40, respectivamente. Para a visualização da imunomarcação dos colágenos, os cortes foram lavados em PBS com Tween₂₀ 0,05% e incubados por 90 minutos com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fluoresceína (*Sigma, St. Louis, MO, EUA*), diluído 1:100 em solução azul de Evans 0,006% em PBS. Posteriormente, as lâminas foram novamente lavadas em PBS com Tween₂₀ 0,05% e montadas com glicina tamponada. Finalmente, as reações foram visualizadas em um microscópio de fluorescência *Olympus BX-51*.

3. 6. Imunofluorescência para os colágenos I, III e V no tendão e ligamentos

Cortes longitudinais do tendão calcâneo e dos ligamentos (LCM, LCL e LP) de ratos Wistar, preparados em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriethoxy silano (Sigma), foram imersos em xilol quente por 20 minutos, a seguir submetidos a dois banhos de xilol frio e hidratados com sucessivas lavagens com álcool etílico, em concentrações decrescentes (100%-75%), água destilada e PBS. Para a exposição e recuperação de sítios antigênicos, foi realizado tratamento enzimático com pepsina bovina (10000 unidades de tecido digerido (UTD) - *Sigma, Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA*) em tampão ácido (pH=2.2), na proporção de 4 mg/ml em ácido acético a 0,5M, por 45 minutos a 37°C. Os cortes tratados foram lavados por três vezes, 10 minutos cada, com PBS e a reação foi bloqueada com leite Molico a 5% em PBS durante 30 minutos. As lâminas foram incubadas durante uma noite com os anticorpos policlonais anticolágeno dos tipos I (1:200) e V (1:500) feitos em coelho e o anticolágeno III monoclonal (1:2000) (Calbiochem Inc, San Diego, CA), diluído em solução de PBS. Após este período, os cortes foram lavados em PBS com Tween 20 0.05% e incubados por 1 hora e 30 minutos com anticorpo secundário anti-IgG de coelho e/ou camundongo conjugado com fluoresceína (*Sigma, Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA*) diluído 1:50 em solução de PBS, contendo azul de Evans 0,006% e montadas com solução de glicerina tamponada. A reação foi analisada em microscópio de fluorescência *Olympus BX-51*.

3. 7. Imunofluorescência para os colágenos I, III e V na sinóvia

Cortes longitudinais da articulação do joelho de ratos Wistar, preparados em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriethoxy silano (Sigma), foram imersos em xilol aquecido a 60°C por 20 minutos, a seguir submetidos a dois banhos de xilol a temperatura ambiente e hidratados com sucessivas lavagens com álcool etílico, em concentrações decrescentes (100%-75%), água destilada e PBS.

Para a exposição e recuperação de sítios antigênicos, foi realizado tratamento enzimático com pepsina bovina (10000 unidades de tecido digerido (UTD) - *Sigma, Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA*) em tampão ácido (pH=2.2), na proporção de 2 mg/500µl em ácido acético a 0,5M, por 45 minutos a 37°C. Os cortes tratados foram lavados por três vezes, 10 minutos cada, com PBS e a reação foi bloqueada com leite Molico a 5% em PBS durante 30 minutos. As lâminas foram incubadas durante uma noite com os anticorpos policlonais anticolágeno dos tipos I (1:200) e V (1:500) feitos em coelho e o anticolágeno III monoclonal (1:2000) (Calbiochem Inc, San Diego, CA), diluído em solução de PBS. Após este período, os cortes foram lavados em PBS com Tween 20 0.05% e incubados por 1 hora e 30 minutos com anticorpo secundário anti-IgG de coelho e/ou camundongo conjugado com fluoresceína (*Sigma, Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA*) diluído 1:50 em solução de PBS, contendo azul de Evans 0,006% e montadas com solução de glicerina tamponada. A reação foi analisada em microscópio de fluorescência *Olympus BX-51*.

3. 8. Imunohistoquímica para metaloproteinase 9 e inibidores de metaloproteinases 1 e 2 na cartilagem articular

A imunomarcagem foi realizada em cortes descalcificados das articulações, pelo método Biotina-estreptavidina peroxidase no Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP. Para tanto, cortes das articulações de aproximadamente 4 micrômetros serão aderidos a lâminas previamente tratadas com aminosilano, desparafinizados em xilol e reidratados com banhos de álcool etílico, com concentrações decrescentes (100% - 75%), água corrente (10 minutos), água destilada e tampão fosfato pH 7,4 (PBS). Posteriormente, a recuperação antigênica foi realizada em alta temperatura (125°C) em panela de pressão imersas em tampão acetato de sódio pH=6,0. Os cortes tratados foram lavados 3 vezes por 10 minutos, com PBS e deixados incubando com leite desnatado 5% em PBS, durante 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos, com PBS e deixadas em incubação com leite desnatado 5% em PBS, durante 15 minutos. Subseqüentemente, as lâminas foram incubadas por uma noite, com os anticorpos primários contra a metaloprotease MMP-9 e TIMPs 1 e 2 as quais foram colocadas em câmara úmida. Após três lavagens com tampão fosfato pH 7,4 (PBS) as lâminas foram encubadas com anticorpos secundários conjugados com biotina-estreptavidina por mais 1 hora, lavadas e contra coradas com hematoxilina. As lâminas foram desidratadas para a montagem em resina e analisadas em microscópio óptico.

3.9. Imunohistoquímica para detecção de endotelina-1

Cortes transversais de sinóvia de ratos foram preparados em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropilttriethoxy Silano (Sigma) e desparafinizadas com banhos de xilol e em etanol com concentrações decrescentes. A recuperação antigênica foi seguida segundo o fabricante, utilizando solução de citrato 10mM, pH 6,0 à 95-100 °C. Após 35 minutos as lâminas foram retiradas e permaneceram mais 20 min em temperatura ambiente para esfriar. Então foi realizada a lavagem em PBS por 3 vezes, 3 minutos cada. Na seqüência foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, lavando-se as lâminas em peróxido de hidrogênio 10V (3%) e posteriormente em água corrente e PBS. O bloqueio de sítios inespecíficos foi com leite desnatado 2% diluído em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti endotelina-1 (Santa Cruz Biotechnology Inc), após diluições apropriadas em soro albumina bovina (BSA, sigma), em câmara úmida a 4°C, durante 18 horas. Após este período de incubação as lâminas foram lavadas em PBS 3 vezes durante 3 minutos e em seguida foram incubadas com o anticorpo secundário LSAB-HRP (large streptavidin-avidin-biotin–system peroxidase; k-060; Dako A/S, Copenhagen, Denmark), conforme a seguinte seqüência se utilização: primeiramente foi incubado o anticorpo secundário por uma hora a 37°C, em seguida as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com estreptovidina-biotinilada peroxidase por 45 minutos a 37°C. Após 3 banhos de 3 minutos em PBS, foi realizada a revelação: as lâminas foram colocadas no cromógeno (3-3'-diaminobenzamidina –DAB 100mg em 70mL de

PBS+3mL de água oxigenada; Sigma Diagnostics, St Louis, USA) por 5 minutos, lavadas em água corrente por mais 5 minutos, contracoradas em hematoxilina de Harris (Sigma Diagnostics, St Louis, USA) por 30 segundos e novamente lavadas em água corrente por cinco minutos, para serem desidratadas, foram submergidas por 3 vezes em álcool 70%, 3 vezes em álcool 95%, 3 vezes em álcool absoluto e mais 3 vezes em xilol.

Para controle positivo foi utilizado tecido de língua, sabidamente positivo para estes marcadores. Para controles negativos foram utilizadas lâminas do mesmo tecido, incubadas com BSA.

4. RESULTADOS

4. 1. Características do modelo experimental

Os animais foram considerados diabéticos quando apresentaram valores de glicemia acima de 200 mg/dl, sabendo-se que o valor normal da taxa glicêmica é em torno de 100mg/dl. Após a infusão de estreptozotocina, observou-se aumento dos níveis de glicemia e da concentração de anti-CML plasmática nos animais do grupo diabético em relação aos do grupo controle. Após 70 dias os animais do grupo diabético apresentaram menos peso em comparação ao grupo de animais controle (**Tabela1**). Foram ainda observadas durante o experimento a presença de polidipsia e poliúria em todos os animais do grupo diabético.

Tabela 1. Características gerais dos grupos diabéticos e controle após 1 e 70 dias da administração de estreptozotocina.

	1 (dia)	70 (dias)
<i>Peso corporal (g)</i>		
Diabetico	223±26	263± 19,97 *
Controle	229.5±32	460.46 ± 65.43
<i>Glicemia (mg/dl)</i>		
Diabetico	75.8±7.4	377 ±37.53 *
Controle	78.3±6.7	97.46±6.7
<i>Anti-CML plasmático (ng/mL)</i>		
Diabetico	-	2.88 ±1.05 *
Controle	-	1.55 ± 0.61

* $p < 0,05$ comparado aos controles

4. 2. Avaliação morfológica da cartilagem

A análise morfológica da cartilagem articular nos animais do GC mostrou a superfície articular homogênea, assim como a organização dos condrócitos em camadas na superfície e em pilhas nas regiões mais profundas do tecido e adjacente ao osso subcondral, compatível com o padrão normal da cartilagem **(Figura 6-A)**. Nos animais diabéticos observaram-se irregularidades na superfície articular, desorganização e intenso aumento da celularidade, acompanhado por um afinamento do tecido cartilaginoso **(Figura 6-B)**.

A cartilagem dos animais do grupo controle corada com tricrômico de Masson mostrou integridade do colágeno, caracterizada pelo aspecto homogêneo da cor azul, a qual no grupo diabético mostrou-se mais intensa **(Figura 6 - C e D)**. Este fato pode ser confirmado pela coloração de Picrosírius sob luz polarizada, onde nota-se integridade da rede de colágeno, através da birrefringência em vermelho (fibras grossas) no grupo controle **(Figura 6- E)**. Ao contrário, no grupo diabético mudanças do padrão da birrefringência para verde-amarelado, indicam alterações na rede de colágeno, com a presença de fibras mais finas e irregulares em relação ao grupo controle **(Figura 6 - F)**.

Figura 6 - Cortes histológicos de cartilagem articular dos animais dos grupos controle (A, C e E) e grupo diabético (B,D,F). Os tecidos foram corados com H&E (A e B), tricrômico de Masson (C e D) e Picrosírius (E e F). Em A, observamos a superfície articular homogênea com ausência de desorganização condrocitária tanto na superfície cartilaginosa como junto ao osso subcondral. Em B, notamos irregularidades da superfície articular (seta fina) assim como intensa desorganização e aumento da celularidade (seta grossa). Observamos em (C) integridade do colágeno, caracterizada pelo aspecto homogêneo da coloração azul do tricrômico de Masson que permanece em (D). Já em E, notamos a integridade da rede de colágeno (birrefringência em vermelho) e em F alterações na rede de colágeno, com mudança do padrão da birrefringência (verde-amarelado), indicando a presença de fibras mais finas e irregulares (seta).

4. 3. Avaliação quantitativa do colágeno da cartilagem articular

A análise quantitativa da porcentagem de fibras de colágeno na cartilagem articular pelo Picosírius indicou maior quantidade de fibras finas no grupo diabético em relação ao grupo controle (**Figura 7 – B**). Por outro lado, o conteúdo de fibras grossas no grupo diabético foi menor que no grupo controle, respectivamente. (**Figura 7 – A e Tabela 2**).

Figura 7 - Box Plot mostrando a porcentagem de fibras grossas (A) e fibras finas (B) na cartilagem nos grupos controle e diabético.

4. 4. Avaliação morfométrica da cartilagem

A análise morfométrica da cartilagem revelou um aumento no número de condrócitos no grupo diabético quando comparada com o grupo controle. adicionalmente, observou-se diminuição de proteoglicanas, bem como diminuição da espessura cartilaginosa do grupo diabético quando estes dados foram comparados ao grupo controle (**Figura - 8 e Tabela 2**).

Figura 8 - Cortes histológicos da cartilagem corados com Safranina O/Fast-green – (A e B) indicam a presença de proteoglicanas (em vermelho). Notar menor expressão de proteoglicanas em ratos diabéticos (B) em relação aos animais controle (A) (Aumento: 200x)

Tabela 2. Análise morfométrica da cartilagem articular do joelho de animais diabéticos e controles.

	Celularidade (μm^2)	Espessura (μm^2)	Proteoglicanas (%)
Diabéticos (n=15)	12.78 $\pm$ 2.64 *	93.46 $\pm$ 10.02 *	28.91 $\pm$ 23.38 *
Controles (n=15)	9.43 $\pm$ 1.38	68.40 $\pm$ 12.13	55.48 $\pm$ 25.94

* $p < 0.05$ Diabéticos vs. controles

4. 5. Quantificação da MMP-9 e análise da expressão de TIMP1 e TIMP2

A imunomarcção para MMP-9 no tecido cartilaginoso apresentou aumento no grupo diabético, em relação ao controle. Ao contrário, observou-se diminuição na expressão do TIMP-2 em comparação ao GC. Em relação ao TIMP-1, não foi possível uma análise conclusiva devido à sua baixa reatividade na estrutura estudada (**Figura 9 A-F e Tabela 3**).

Figura 9 - Cartilagem articular de ratos diabéticos (B,D,F) e controles (A,C,E) imunomarcada para MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2. Notar aumento da expressão da metaloprotease-9 (MMP-9) em ratos diabéticos (B) em relação aos controles (A), visualizada por imunofluorescência. Imunohistoquímica para os inibidores de metaloprotease 2 (TIMP-2, C e D) e inibidores de metaloprotease 1 (TIMP-1, E e F) em ratos controle e diabéticos. Notar menor expressão de TIMP-2 (D) em ratos diabéticos em relação ao controle (C). (Aumento: 200x)

Tabela 3. Análise da MMP-9 da cartilagem articular de animais diabéticos e controles.

	MMP 9 (%)
Diabéticos (n=15)	26,24±4,74*
Controles (n=15)	5,98±12,28

* $P < 0.05$ Diabéticos vs. controles

4. 6. Análise morfológica da sinóvia

Na sinóvia dos animais avaliadas pela H&E verificamos a membrana sinovial e tecido subsinovial adjacentes perfeitamente preservados no grupo controle, e intenso espessamento da membrana sinovial com substituição da camada de tecido gorduroso por tecido fibroso no grupo diabético (**Figura 10 - A e B**).

Nas sinóvias coradas pelo tricrômico de Masson, observou-se a camada superficial constituída por fibras colagênicas dispostas em paralelo constituindo um padrão normal em forma de traves no tecido subsinovial, que se transformam em um tecido fibroso e espesso substituindo o tecido adiposo adjacente nos animais diabéticos (**Figura 10 - C e D**). Este fato é confirmado através da coloração de Picrosírius, sob luz polarizada, onde observamos que este tecido fibroso é resultante da substituição e desarranjo da rede de fibras colágenas no grupo de animais diabéticos, em relação às sinóvias do grupo controle (**Figura 10- E e F**).

Figura 10 - Cortes histológicos do tecido sinovial corados com hematoxilina-eosina (A,B), tricrômico de Masson (C,D) e Picrosírius sob luz polarizada (E,F). No animal do grupo controle, verificamos a membrana sinovial (seta) e tecido sub-sinovial perfeitamente preservados (A), camada superficial constituída por fibras colagênicas dispostas em paralelo, vista na coloração azul do tricrômico de Masson (seta) (C), estas fibras podem ser evidenciadas na coloração de Picrosírius sob luz polarizada (E). Nos animais do grupo diabético, podemos observar espessamento da membrana sinovial (seta) e substituição da camada de tecido gorduroso por tecido fibroso (seta grossa) (B), no tricrômico de Masson este tecido fibroso que substitui a camada adiposa pode ser apreciado na coloração azulada (seta) (D), e esta substituição e o desarranjo das fibras de colágeno, podem ser observados na coloração de Picrosírius sob luz polarizada (seta) (F).

4. 7. Avaliação quantitativa do colágeno da sinóvia

A análise quantitativa da porcentagem de fibras de colágeno na sinóvia pelo Picrosírius indicou maior quantidade de fibras grossas no grupo diabético em relação ao grupo controle (**Figura 11 – B**). Por outro lado, o conteúdo de fibras finas de colágeno, no grupo diabético, foi menor que nos animais controle, respectivamente. (**Figura 11 – A e Tabela 4**).

Figura 11 - Box Plot mostrando a porcentagem de fibras finas (A) e fibras grossas (B) na sinóvia nos grupos controle e diabético.

4. 8. Avaliação da expressão de endotelina-1 nas células endoteliais da sinóvia

A expressão da endotelina-1 foi maior no endotélio vascular da sinóvia do grupo diabético, acometendo tanto os grandes como os pequenos vasos (**figura 12**).

Figura 12 – Expressão de endotelina-1 (seta) no endotélio vascular da sinóvia dos animais controle (A) e diabéticos (B). Aumento: 400x

4. 9. Análise morfológica do tendão calcâneo e ligamentos

No tendão calcâneo observou-se ausência de infiltrado inflamatório e fibrose, assim como moderado espessamento das fibras de colágeno, evidenciada pela mudança na coloração da birrefringência dessas fibras entre o grupo diabético e controle. Estes achados foram semelhantes às alterações observadas nos ligamentos: patelar, colateral medial e colateral lateral analisado previamente (**Figuras 13, 14, 15 e 16**).

Figura 13 - Cortes longitudinais de Tendão Calcâneo obtidos de animais controles e diabéticos. A e B – Hematoxilina-Eosina; C e D – Tricrômico de Masson; E e F – Picrosirius. Aumento 400X.

Figura 14 - Cortes longitudinais de Ligamento Patelar obtidos de animais controles e diabéticos. A e B – Hematoxilina-Eosina; C e D – Tricrômico de Masson; E e F – Picrosirius. Aumento 400X.

Figura 15 - Cortes longitudinais de Ligamento Colateral Medial obtidos de animais controles e diabéticos. A e B – Hematoxilina-Eosina; C e D – Tricrômico de Masson; E e F – Picrosirius. Aumento 400X.

Figura 16 - Cortes longitudinais de Ligamento Colateral Lateral obtidos de animais controles e diabéticos. A e B – Hematoxilina-Eosina; C e D – Tricrômico de Masson; E e F – Picrosirius. Aumento 400X.

4. 10. Avaliação quantitativa do colágeno do tendão calcâneo e dos ligamentos

Através da análise da variação de cor das fibras colágenas dos ligamentos patelar, colateral medial, colateral lateral e do tendão calcâneo evidenciou-se que as fibras finas tiveram um aumento significativo no grupo diabético em relação ao grupo controle (**Figura 17 B,D,F,H e Tabela 2**). Ao contrário, as fibras grossas mostraram diminuição de conteúdo no grupo diabético quando comparado ao grupo controle (**Figura 17 A,C,E,G e Tabela 4**).

Tabela 4 – Porcentagem de colágeno de fibras finas e grossas de colágeno do tendão calcâneo (TC), ligamentos patelar (LP), colateral medial (LCM) e colateral lateral (LCL), cartilagem e sinóvia de animais controle e diabéticos.

	TC	LP	LCM	LCL	Cartilagem	Sinóvia
Fibras finas (%)						
Diabéticos	79,80±14,11*	74,30±21,43*	70,31±19,81*	72,03±15,66*	23.06±16.07*	16.29±6.10*
Controles	19,65±5,66	16,11±6,49	17,02±6,4	19,04±10,02	4.79±7	21.39±6.14
Fibras grossas (%)						
Diabetes	21,11±18,28*	25,71±21,41*	31,54±22,09*	27,96±15,66*	28.64±8.21*	22.70±8,20*
Controles	80,34±5,66	83,88±6,49	82,97±6,4	80,95±10,02	33.05±8.53	14.45±5,39

* $P < 0.05$ comparado com controles.

Figura 17 – *Box Plot* mostrando a porcentagem de fibras grossas e finas do ligamento patelar (A e B), no ligamento colateral medial (C e D), no ligamento colateral lateral (E e F) e do tendão calcâneo (G e H) no grupo diabético em relação ao controle.

4. 11. Avaliação dos tipos de colágeno na cartilagem, tendão calcâneo e ligamentos por imunofluorescência

A expressão do colágeno tipo II (fibras grossas) na cartilagem articular dos animais diabéticos mostrou uma intensa diminuição da imunomarcagem para esta proteína tanto na superfície quanto nas regiões intermediária e profunda, e esteve presente apenas na região pericondrocitária (**Figura 18, painéis A e B**).

No entanto, a imunomarcagem para o colágeno do tipo XI (fibras finas) foi mais intensa no grupo diabético, principalmente nas regiões pericondrocitária, superficial, intermediária e profunda comparada à expressão de colágeno XI somente na região pericondrocitária do grupo controle (**Figura 18, painéis C e D**).

Na imunofluorescência da sinóvia foram confirmados os resultados morfométricos encontrados no Picrosirius, sendo observado aumento na expressão de colágeno do tipo I e diminuição dos tipos III e V no grupo diabético comparados com o grupo controle, como evidenciado na **Figura 19**.

O ligamento patelar e tendão calcâneo do grupo diabético apresentaram a mesma alteração da cartilagem articular com maior expressão de colágeno de fibras finas do tipo III (**Figura 21, painéis de A a H**) e V (**Figura 22, painéis de A a H**) e diminuição na expressão do colágeno de fibras grossas do tipo I (Figura 20, painéis de A a H).

Figura 18 - Imunofluorescência para os tipos de colágeno II e XI em articulação de ratos com indução de diabetes e controles. Aumento: 400x

Figura 19 - Imunofluorescência para os colágenos dos tipos I (A e B), III (C e D) e V (E e F) em sinóvia de animais diabéticos e controles. Notar aumento da expressão do colágeno do tipo I (B) e diminuição da expressão do colágeno dos tipos III (D) e V (F) no grupo diabético. Os painéis A, B e C mostram distribuição normal dos colágenos I, III e V, respectivamente. Aumento: 200x.

Figura 20 - Imunofluorescência para colágeno I de Ligamentos obtidos de animais controles e diabéticos. A e B – Patelar; C e D – Colateral Medial; E e F – Colateral Lateral; G e H – Tendão Calcâneo. Aumento: 400x.

Figura 21 - Imunofluorescência para o colágeno III de Ligamentos obtidos de animais controles e diabéticos. A e B – Patelar; C e D – Colateral Medial; E e F – Colateral Lateral; G e H – Tendão Calcâneo. Aumento: 400x.

Figura 22 - Imunofluorescência para o colágeno V de Ligamentos obtidos de animais controles e diabéticos. A e B – Patelar; C e D – Colateral Medial; E e F – Colateral Lateral; G e H – Tendão Calcâneo. Aumento: 400x.

6. DISCUSSÃO

A proposta desse estudo foi avaliar a estrutura da MEC principalmente das fibras colágenas na cartilagem articular, sinóvia, ligamentos e tendão calcâneo após a indução de diabetes com estreptozotocina. O remodelamento do colágeno na cartilagem, ligamentos e tendão calcâneo se processa a custa do aumento na quantidade de fibras finas, diminuição das grossas e proteoglicanas da cartilagem articular nos animais diabéticos. Por outro lado foi surpreendente o intenso remodelamento das fibras colágenas encontrado no tecido sinovial devido ao aumento de fibras grossas e diminuição das finas, resultado muito diferente dos outros componentes da articulação.

Estes dados podem indicar que a hiperglicemia adquirida pelos animais foi capaz de atingir o tecido sinovial provavelmente em curto espaço de tempo, pois enquanto a cartilagem, ligamentos e tendão apresentavam uma estrutura fibrilar fina e conseqüentemente de síntese mais rápida, a sinóvia já apresentava morfologia característica de um processo de fibrose. Este fato pode ser explicado pela rica estrutura vascular apresentada pelo tecido sinovial, pertinente a sua principal função, entre outras, que é a de nutrir os componentes da articulação. (25)

Estes resultados possuem uma implicação direta com a limitação da mobilidade articular observada em pacientes diabéticos, que é caracterizada por rigidez indolor e não inflamatória das mãos, pés e articulações maiores

(3,4). Estas restrições articulares não são de origem óssea, mas sim resultante de mudanças no tecido conjuntivo periarticular (7).

Em um tendão lesionado o diabetes afeta a atividade biológica essencial para o processo de cicatrização, assim como uma expressiva redução do número de neutrófilos, macrófagos, da angiogênese e proliferação celular, retardando o processo de cura no tendão de pacientes diabéticos.(3,7,8).

Modelos experimentais de diabetes em ratos confirmam estes resultados devido ao fato de apresentarem diminuição da angiogênese no tendão, o que compromete principalmente a região central do tecido pela excessiva modulação da proliferação celular (16). Por outro lado a maior incidência de lesões do tendão em pacientes diabéticos também pode ser explicada pela intensa desorganização das redes de colágeno (3).

Em nosso estudo através da identificação dos tipos de colágeno por imunofluorescência, observamos a formação de verdadeiras redes de fibras finas, identificadas como colágeno dos tipos III e V nos ligamentos e tendões, enquanto as fibras de colágeno do tipo I diminuem intensamente sua expressão nos de ratos diabéticos resultando em um tecido conjuntivo totalmente alterado no que diz respeito a sua estrutura e desempenho de suas funções.

É bem estabelecido que a deposição de colágeno do tipo III é um fenômeno observado em estágios iniciais de fibrose, enquanto em estágios mais avançados há predomínio de depósito de colágeno do tipo I (46). Este fato mais uma vez nos leva a pensar que o tecido sinovial é um grande

alvo de acometimento articular no diabetes, sofrendo lesões importantes nos estágios mais precoces da doença.

Outros fatores de grande importância também podem ser responsáveis pelo espessamento fibrilar encontrado na sinóvia no presente estudo, como a associação de diferentes tipos de colágeno formando fibras heterotípicas que podem regular o diâmetro das fibras colágenas resultando na formação de fibras espessas constituídas de mais de um tipo de colágeno. (44).

As fibras heterotípicas são compostas de diferentes combinações de fibrilas de colágeno determinando a união de fibrilas entre diferentes tipos de colágeno e ainda entre fibrilas do mesmo tipo colágeno. Este fato suporta a hipótese que esta propriedade entre as fibrilas pode também ser responsável pela regulação do diâmetro das fibras, sugerindo que a associação entre seus tipos pode alterar a distribuição e a fibrilogênese das fibras de colágeno (45).

Foi demonstrado que o aumento no diâmetro da fibrila pode estar associado a proporção entre seus tipos em uma fibra heterotípica, sugerindo que a diminuição do colágeno do tipo III em relação a quantidade de colágeno do tipo I e ao tipo V pode alterar ou ainda interromper o processo de fibrilogênese (27,28,29). Portanto, o colágeno do tipo I é o principal componente estrutural das fibrilas, enquanto outros tipos (III ou V) regulam a espessura, a união entre as fibrilas e estão localizados na periferia da fibra como o colágeno do tipo III ou parte na periferia e parte no interior da fibra de colágeno I como o tipo V (30).

No presente estudo a localização das fibras finas coencidem com a imunomarcacão para os colágenos dos tipos III e V nos ligamentos e tendões dos animais diabéticos e o tipo I na região de fibras mais grossas comparados aos animais do grupo controle. Na cartilagem articular esta relação também permaneceu para o colágeno dos tipos II e XI respectivamente.

O colágeno do tipo V participa da fibrilogênese regulando o tamanho e o diâmetro das fibras de colágeno e, portanto este colágeno pode influenciar diretamente no remodelamento da ECM (9). Foi observado em atletas do sexo feminino que o gene COL5A1, que codifica a cadeia $\alpha 1$ de colágeno tipo V está associado com a ruptura do ligamento cruzado anterior (31). Nossos dados reforçam a possibilidade de que processos patológicos podem se desenvolver devido ao aumento do colágeno de fibra fina.

Na cartilagem articular dos animais do GD o aumento e a distribuição de fibras finas foram identificados através de imunofluorescência como sendo fibras de colágeno XI, mas outros tipos podem estar associados como o colágeno IX e outros, mas a função de regular o diâmetro das fibras da cartilagem estão relacionadas com o colágeno do tipo XI assim como o tipo V com a regulação do diâmetro em outros tecidos. Portanto, o aumento da quantidade dessas fibras finas sugere a ocorrência de um intenso remodelamento do colágeno XI após a indução do diabetes (4,32,33).

Nossos resultados mostram que a cartilagem articular do DG apresenta uma mudança na proporção entre o colágeno II e XI após a

indução da doença, mas ainda pode estar refletindo estágios precoces da doença degenerativa.

A membrana sinovial é responsável por manter a homeostase e a função articular normal. Na membrana sinovial, as células mais estreitamente associadas a esta função homeostática são as células semelhantes aos fibroblastos sinoviais que tem alta capacidade de síntese. Estas células influenciam no efeito da idade soro albumina bovina modificada (AGE-BSA) sobre o crescimento celular e na expressão de marcadores inflamatórios e osteoclastogênicos no FLS cultura (34). Os AGEs modula o crescimento e a expressão de genes envolvidos no processo fisiopatológico da osteoartrite que pode resultar no comprometimento estrutural e funcional das articulações (35). Os AGEs modulam o crescimento e a expressão de genes envolvidos na fisiopatologia da osteoartrose, levando ao comprometimento estrutural e funcional das articulações (35).

O mecanismo básico mais provável para a limitação da mobilidade articular é a diminuição da degradação do colágeno relacionada ao aumento da glicação, com a formação de AGE e aumento de ligações cruzadas (5,6,35).

O remodelamento do colágeno no tecido sinovial em modelo experimental de diabetes foi caracterizada por um espessamento do tecido devido a um aumento na espessura das fibras de colágeno. Esta participação pode estar relacionada também com a presença de AGE, que pode influenciar na modificação fenotípica do sinoviócitos, no crescimento

celular e na expressão de marcadores inflamatórios e osteogênese, resultando na estimulação da síntese de colágeno. Desta forma poderíamos inferir que a prevalência de comprometimento estrutural das articulações em pacientes diabéticos.

Em modelos experimentais de DM foi observado um aumento de ligações cruzadas interfibrilares nas fibras de colágeno do tipo II levando uma interligação entre as diferentes microfibrilas. Estas observações podem eventualmente estar associadas ao espessamento das fibrilas de colágeno encontradas sob condições diabéticas “in vivo” e “in vitro”. (36)

Em nossos resultados ainda demonstramos evidências que a disfunção endotelial pode estar fortemente associada a complicações microvasculares devido à expressão de endotelina-1 encontrada no tecido sinovial.

Sabendo-se que a fibrilogênese depende da presença de proteínas da matriz extracelular como a fibronectina, laminina e integrinas aliadas a presença dos colágenos V ou XI podemos inferir que a proporção de colágeno V e XI pode interferir na fibrilogênese dos componentes articulares e consequentemente estar associado a limitações funcionais desta articulação. (46) Todo este comprometimento pode acelerar as limitações funcionais piorando a qualidade de vida destes pacientes. Neste aspecto os modelos experimentais de diabetes e celulares serão de grande importância para se esclarecer a patogênese das alterações articulares nesta enfermidade, assim como contribuir para o desenvolvimento de novas condutas terapêuticas relacionadas as articulações em diabéticos.

7. CONCLUSÕES

Após a avaliação dos componentes articulares no modelo experimental de diabetes por estreptozotocina chegamos às seguintes conclusões:

1. O diabetes induzido em ratos por estreptozotocina altera a estrutura da matriz extracelular dos componentes articulares, através do remodelamento das fibras colágenas e que esta mudança foi diferente entre os tecidos comprometidos.
2. As alterações de celularidade, fibras de colágeno e dos proteoglicanos, aumento da atividade enzimática e de seus inibidores contrastam com o processo degenerativo da osteoartrite humana.
3. A cartilagem, os ligamentos e o tendão calcâneo apresentaram remodelamento similar das fibras de colágeno com substituição de seus tipos e predominância de fibras finas alterando a histoarquitetura dos tecidos, podendo justificar o comprometimento funcional da articulação.
4. O desenvolvimento de fibrose no tecido sinovial aliado a ativação endotelial pode interferir na nutrição da cartilagem e comprometimento de sua função.

5. A substituição dos tipos de colágeno nos tecidos articulares pode representar uma das causas do acometimento das pequenas e grandes articulações no diabetes.
6. Modelos experimentais de diabetes serão de grande importância para o esclarecimento da patogênese das alterações articulares no diabetes, contribuindo para o desenvolvimento de novas condutas terapêuticas relacionadas ao comprometimento articular em pacientes diabéticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diabetes Care. Diagnosis and classification of diabetes Mellitus. Volume 32. Supplement 1, 2009.
2. Maraschin, JF, Murussi N, Witter, V, Silveiro, SP. Diabetes mellitus classification. *Arq. Bras. Cardiol*, 2010 v. 2, n. 95, p.40-46
3. Chbinou, N, Frenette, J. Insulin-dependent diabetes impairs the inflammatory response and delays angiogenesis following Achilles tendon injury. 2004. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 286: R952–R57. 3
4. Le Pape, A, Muh, JP, Bailey, A. Characterization of N-glycosylated type I collagen in streptozotocin-induced diabetes. 1981. *Biochem. J*. 197:405-12. 4
5. C Arkkila PE, Koskinen PJ, Kantola IM, Rönnemaa T, Seppänen E, Viikari JS. Biochemical markers of types I and III collagen and limited joint mobility in type 1 diabetic patients. *Acta Diabetol* 2003;40(4):151-59
6. Douloumpakas I, Pyrpasopoulou A, Triantafyllou A, Sampanis Ch, Aslanidis S Prevalence of musculoskeletal disorders in patients with type 2 diabetes mellitus: a pilot study. *Hippokratia*. 2007 Oct–Dec; 11(4): 216–18.

7. Wang H, Layton BE, Sastry AM. Nerve Collagens from diabetic and nondiabetic Sprague-Dawley and biobreeding rats: an anatomic force microscopy study. 2003. *Diabetes/Metabolism research and reviews*, 19: 288-98.
8. Brennan M. *Changes in Solubility, Non-enzymatic Glycation, and Fluorescence of Collagen in Tail Tendons from Diabetic Rats*. 1989. *J Biol Chem*. Vol. 264, No. 35, Issue of December 15, pp. 20947- 52. 6
9. Parry DAD, Craig AS. Collagen fibrils during development and maturation and their contribution to the mechanical attributes of connective tissue. In: Nimni ME (ed.) *Collagen*. Vol II. Boca-Raton, CRC Press, 1988. P1-23
10. Montes GS Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 1996 Jan;20(1):15-27.
11. Linsenmayer, TF, Collagen In: Hay, ED ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2.ed. 1991. New York, Plenum Press. p. 7-43.
12. Prockop, DP, Kivirikko, KL, Tuderman, L, Guzman, NA, The biosynthesis of collagen and its disorders. 1979 *N. England J. Med*, v. 301, n. 1, p 12-23.

13. Alberts, B, Bray, D, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Watson, JD, Molecularbiologyof the cell. 3. Ed. *New York & London*, Garland, 1994, p. 971-84: The extracellular matrix of animais.
14. Veit G, Kobbe B, Keene D, Paulsson M, Koch M, Wagener R. Collagen XXVIII, a novel von willebrand factor a domaincontaining protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem* 2006; 281:3494–04.
15. Darnell, JE, Lodish, H. *Scientific American Books ed. Molecular Cell Biology*. Baltimore. 3. Ed. Baltimore. 1995. p. 1124-35
16. Stefek M, Gajdosik A, Gajdosikova A, Krizanova L. P-dimethylaminobenzaldehyde-reactive substances in tail tendon collagen of streptozotocin-diabetic rats: Temporal relation to biomechanical properties and advanced glycation endproduct (AGE)-related fluorescence. 2000. *Biochim Biophys Acta*. 1502, 398-04.
17. Turk Z, Misur I, Turk N, Benko B. Rat tissue collagen modified by advanced glycation: correlation with duration of diabetes and glycemic control. 1999. *Clin. Chem. Lab. Méd.* 37(8):813-20, Aug.

18. Ren L, Fu Y, Deng Y, Qi L, Jin LJ . Advanced glycation end products inhibit the expression of collagens type I and III by human gingival fibroblasts. 2009 Jul; *J Periodontol.* 80(7):1166-73
19. SHAKIBAEI M, MERKER H J. β 1-Integrins in the cartilage matrix. 1999; *Cell Tissue Res*, v. 296, p. 565-73.
20. S Morris, N P, Bachinger, HP. Type XI collagen is a heterotrimer with the composition (α 1, α 2 e α 3) retaining none-triple-helical domains. *J. Biol.*, v. 262, p.11345-50, 1987.
21. Eyre, DR, WU, J-J. Collagen structure and cartilage matrix integrity. *J. Rheumatol.*, v. 22, n.1, p. 82-5, 1995, supplement 43.
22. Gregory, K, Oxford, JT, Chen, Y. Structural Organization of distinct domains within the non-collagenous N-terminal region of collagen type XI. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 15, p. 11498-06, 2000
23. Brandt, KD, Mankin, HJ, Pathogenesis of osteoarthritis In: Kelley, WN, Harris, ED, Ruddy, S, Sledge, CB, 4 ed. *Text Book of rheumatology*. Philadelphia, Saunders, 1993. P 1355-65
24. Edwards JCW. Synovial intimal fibroblasts. 1995. *Ann Rheum Dis* 54:395-7.
25. McGonagle D, Tan AL, Carey J, Benjamin M. The anatomical basis for a novel classification of osteoarthritis and allied disorders. *J Anat.* 2010 Mar;216(3):279-91. Epub 2010 Jan 7.

26. Blewis ME, Nugent-Derfus GE, Schmidt TA, Schumacher BL, Sah RL. A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *Eur Cell Mater.* 2007 Mar 6;13:26-39.
27. Nguyen, Q, Mort, JS, Roughley, PJ. Preferential mRNA expression of prostromelysin relative to procollagenase and in situ localization in human articular cartilage. *J. Clin. Invest.*, v. 89, p. 1189-97, 1992.
28. Jun JB, Kuechle M, Harlan JM, Elkon KB. Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. *Curr Op Rheumatol* 15:756-60, 2003.
29. Mokone GG, Schwellnus MP, Noakes TD, Collins M. The COL5A1 gene and Achilles tendon pathology. 2006; *Scand J Med Sci Sports.* 16(1):19-26.
30. Silver FH, Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech.* 2003 Oct;36(10):1529-53
31. Lindsa JR, Kenne LA, Atkinson B, Bell PM, Carson DJ, McCance DR. Reduced Prevalence of Limited Joint Mobility in Type 1 Diabetes in a U.K. Clinic Population Over a 20-Year Period. 2005. *Diabetes Care* 28:658-61.
32. Reinolds, JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. 1996; *Oral Dis.*, v. 2, n.1, p. 70-6.

33. Nagase, H, Okada, Y. Proteinases and matrix degradation. In: Kelley, WN, Ruddy, S, Harris, ED, Sledge, CB, 5. ed., *Text book of rheumatology*, Philadelphia, Saunders, 1997. p. 323-42.
34. Freemont, AJ, Hampson, V, Tilman, R, Goupille, P, Taiwo, Y, Hoyland, JA. Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann. Rheum. Dis.*, v. 56, p. 542-9, 1997.
35. Pelletier, JP, Mineau, F, Faure, MP, Martel-Pelletier, J. Imbalance between the mechanisms of activation and inhibition of metalloproteases in the early lesions of experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, v.33, n.10, p. 1466-76, 1990.
36. Mather, KJ; Mirzamohammadi, B; Lteif, A; Steinberg, HO; Baron, AD. Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 Dec;51(12):3517-23.
37. Novelli M, Fabregat ME, Fernandez-Alvarez J, Gomis R, Masiello P. Metabolic and functional studies on isolated islets in a new rat model of type 2 diabetes. 2001. *Mol Cell Endocrinol*. 175: 57-66.

38. Tonra JR, Cliffer KD, Carson SR, Lindsay RM, Sue C. Bodine and Di Stefano PS. Reduced Ia-afferent-mediated Hoffman reflex in streptozotocin-induced diabetic rats. 2001. *Exp Neurol*. 172: 220-27.
39. Bolzán AD, Bianchi MS. Genotoxicity of Streptozotocin. 2002. *Mutat Res*. 512: 121-34.
40. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Woiman M. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* 1989;93:27-29.
41. Junqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picrosiriuspolarization method. *Histochemistry* 1982;74:153–15.
42. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379-394.
43. Kenyon NJ, Ward RW, McGrew G, Last JA. TGF- β 1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice. *Thorax* 2003;58:772–777.

-
44. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005;118:1341-1353.
 45. Birk DE, Mayne R. Localization of collagen type I, III and V during tendon development. Changes in collagen type I and III are correlated with changes in fibril diameter. *Eur J Cell Biol* 1997;72:352–361.
 46. Kadler K, Hill A, Canty- Laird E. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators *Curr Opin Cell Biol.* 2008 October; 20(5-): 495–01