

**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 Infeciosos.

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

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
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
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
Objetivos gerais e específicos	24
<b>3. MÉTODOS</b>	<b>26</b>
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
<b>4. RE SULTADOS</b>	<b>36</b>
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
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>64</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>66</b>

## 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 Picrosíríus. 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

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

