



MINISTÉRIO DA SAÚDE

SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

## **Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético**

### **Análise de marcadores genéticos na tendinopatia do tibial posterior**

VITOR ALMEIDA RIBEIRO DE MIRANDA

Rio de Janeiro

2016



MINISTÉRIO DA SAÚDE

SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

***Vitor Almeida Ribeiro de Miranda***

Análise de marcadores genéticos na tendinopatia do tibial posterior

Dissertação submetida ao Curso de Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia como parte do requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Verônica Fernandes Vianna

RIO DE JANEIRO

2016

## **Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético**

### **ANÁLISE DE MARCADORES GENÉTICOS NA TENDINOPATIA DO TIBIAL POSTERIOR**

***VITOR ALMEIDA RIBEIRO DE MIRANDA***

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Verônica Fernandes Vianna

#### **BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Túlio Diniz Fernandes (IOT, USP)

Profa. Dra. Fernanda Moll (UFRJ/ID'Or)

Prof. Dr. Diego Pinheiro Aguiar (INTO)

Prof. Dr. Jamila Perini (INTO; revisora)

Profa. Dra. Maria Eugênia Leite Duarte (INTO; suplente)

Rio de Janeiro  
2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

M672a    Miranda, Vitor Almeida Ribeiro.  
            Análise de marcadores genéticos na tendinopatia do tibial posterior. /  
            Vitor Almeida Ribeiro de Miranda. — 2016.  
            67f.

            Orientadora: Verônica Fernandes Vianna.  
            Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema  
            Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia  
            Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2016.

            1. Pé plano. 2. Polimorfismo. 3. Tendinopatia. 4. Variação genética. 5.  
            Fator de necrose tumoral alfa 6. Tibial posterior. 7. Ortopedia. I. Vianna,  
            Verônica Fernandes, orient. II. Título.

NLM WE XXX

## Dedicatória

---

Para Vilma e Angela

## Agradecimentos

---

Foi muito importante a contribuição de diversas pessoas. Dentre elas gostaria de agradecer primeiramente aos estagiários e estagiárias da DIPES (INTO) por me ajudarem na coleta e processamento das amostras, este foi um trabalho fundamental, porém cansativo. A parte laboratorial que foi desenvolvida no INTO foi especialmente desafiadora para mim, cirurgião ortopedista “especialista”. Teria sido impossível sem a contribuição desse time.

A Dra. Verônica Vianna por me inspirar com a idéia e servir de exemplo como médica e pesquisadora.

Um especial agradecimento à Dra. Jamila Perini, personagem fundamental deste projeto, por manter o moral elevado mesmo nos momentos difíceis.

Ao INTO, onde moro desde 2002! Nesses anos pude vivenciar as mais diversas situações que contribuíram para minha formação como médico cirurgião, como pesquisador e como pessoa.

Aos demais colegas do CAE do Pé, pelo apoio na condução de uma pesquisa em um ambiente profissional no qual ela ainda não está inserida como rotina. Vamos mudar isso! A pesquisa melhora a qualidade da assistência.

A minha família, que cresceu no meio deste ciclo - chegou a Gabi! Esse apoio foi essencial. Eu amo vocês!

## Epígrafe

---

*"Nucleic acids are basically simple. They are at the root of very fundamental biological processes, growth and inheritance."*

Maurice Wilkins, 1962. Palestra do Prêmio Nobel.

## Resumo

---

MIRANDA, Vitor Almeida Ribeiro de. Análise de Marcadores Genéticos na Tendinopatia do Tibial Posterior. Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, 2016.

A Tendinopatia do Tibial Posterior (TTP) é uma doença degenerativa de origem multifatorial, com caráter insidioso e progressivo. Acredita-se que fatores genéticos tenham significativa influência no desenvolvimento desta doença. O fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pleiotrópica associada ao processo de apoptose dos tenócitos, estando relacionada a degeneração primária dos tendões. O objetivo deste estudo foi avaliar a correlação entre TTP e a presença de polimorfismos no gene *TNFA*. Cento e trinta e dois voluntários foram submetidos ao exame clínico para diagnóstico de TTP, e divididos em dois grupos: controle (n=63; sem TTP) e TTP (n=69; com TTP). Todos os voluntários foram submetidos a coleta de saliva para obtenção de DNA a partir de células bucais. Após quantificação, o DNA foi submetido à genotipagem, através do sistema de reação em cadeia de polimerase em tempo real, para detecção de polimorfismos nas regiões rs1800629, rs1799724, rs1799964 no gene *TNFA*. Os resultados mostraram associação altamente significativa entre os genótipos polimórficos (AG+GG) para rs1800629 (p=0.001), assim como o genótipo CC para rs1799724 (p=0.02) com a presença de TTP. O haplótipo GTC no gene *TNFA* não mostrou correlação com o desenvolvimento de TTP. Concluiu-se que o polimorfismo rs1800629 no gene *TNFA* estão associados ao desenvolvimento de TTP.

**Palavras chave:** pé plano, polimorfismo genético, tendinopatia, fator de necrose tumoral tipo alfa.

## Abstract

---

MIRANDA, Vitor Almeida Ribeiro de. Polymorphism is Associated with Posterior Tibial Tendinopathy. Rio de Janeiro, 2016. Thesis (Master in Sciences Applied to Musculoskeletal System) - National Institute of Traumatology and Orthopedics, Rio de Janeiro, 2016.

Posterior Tibial Tendinopathy (PTT) is a degenerative disease of multifactorial etiology. Polymorphisms have been related to other tendinopathies. So, it is believed that genetic factors have significant influence on PTT development. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) is a pleiotropic cytokine associated to the tenocytes apoptosis process and, therefore, related to primary tendon degeneration. The main of this study was to evaluate the correlation between PTT and polymorphisms in *TNFA* gene. One hundred and thirty-two volunteers underwent clinical examination for the diagnosis of PTT, and divided into two groups: control (n = 63; without PTT) and PTT (n = 69; with PTT). Saliva samples were obtained from all volunteers in order to isolate DNA from buccal cells. The DNA genotyping was performed by real time polymerases chain reaction by identification of polymorphisms of the *TNFA* rs1800629, rs1799724, rs1799964 gene regions. Our results showed highly significant association between polymorphic genotype (AG + GG) for rs1800629 (p = 0.001) and the CC genotype for rs1799724 (P = 0.02) with the presence of TTP. No haplotype in *TNFA* gene was correlated with the development of TTP. Based on these results, it was concluded that *TNFA* gene polymorphisms are associated with the development of TTP.

**Keywords:** flat foot, pes planus, genetic polymorphism, tendinopathy, tumor necrosis factor alpha.

## SUMÁRIO

|          |                                                                        |           |
|----------|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                      | <b>16</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b>                                           | <b>18</b> |
| 2.1      | ESTRUTURA E FISIOLOGIA DOS TENDÕES                                     | 18        |
| 2.2      | TENDINOPATIAS                                                          | 25        |
| 2.3      | O FATOR DE NECROSE TUMORAL TIPO ALFA (TNF $\alpha$ ) NAS TENDINOPATIAS | 29        |
| 2.4      | A TENDINOPATIA DO TIBIAL POSTERIOR                                     | 32        |
| 2.5      | HERANÇA GENÉTICA E TENDINOPATIAS                                       | 35        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                                       | <b>40</b> |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>                                              | <b>41</b> |
| 4.1      | PARTICIPANTES                                                          | 41        |
| 4.2      | ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO                                       | 42        |
| 4.3      | ANÁLISE ESTATÍSTICA                                                    | 43        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b>                                                      | <b>45</b> |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO</b>                                                       | <b>49</b> |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÕES</b>                                                      | <b>54</b> |
| <b>8</b> | <b>BIBLIOGRAFIA</b>                                                    | <b>55</b> |
|          | <b>ANEXO I - PERECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>                        | <b>63</b> |
|          | <b>ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>           | <b>65</b> |
|          | <b>ANEXO III - FICHA CLÍNICA DOS PARTICIPANTES</b>                     | <b>67</b> |

## Lista de Siglas e Símbolos

---

|                |                                                 |
|----------------|-------------------------------------------------|
| %              | Percentual                                      |
| ®              | Marca Registrada                                |
| A              | Adenina                                         |
| A/G            | Troca de base A po G                            |
| ANOVA          | Análise de Variância                            |
| AP-1           | Proteína Ativadora um                           |
| <i>BDNF</i>    | Fator Neurotrófico derivado do cérebro          |
| BID            | Domínio Interativo de Morte celular BH3         |
| <i>BMP4</i>    | Fator 4 Morfológico Ósseo derivado de Plaquetas |
| C              | Citosina                                        |
| c-PARP         | Polimerase Ribossômica (clivada)                |
| C/T            | Troca de base C por T                           |
| CA             | California                                      |
| <i>CASP8</i>   | Gene da Caspase 8                               |
| CEP            | Comitê de Ética em Pesquisa                     |
| Ch6            | Cromossomo 6                                    |
| <i>COL12A1</i> | Gene do Colágeno tipo 12 A1                     |
| <i>COL14A1</i> | Gene do Colágeno tipo 14 A1                     |
| <i>COL1A1</i>  | Gene do Colágeno tipo 1 A1                      |
| <i>COL1A2</i>  | Gene do Colágeno tipo 1 A2                      |
| <i>COL3A1</i>  | Gene do Colágeno tipo 3 A1                      |
| COL5A1         | Colágeno tipo 5 A1                              |
| COL5A2         | Colágeno tipo 5 A2                              |
| COL5A3         | Colágeno tipo 5 A3                              |
| COMP           | Proteína Oligomérica de Matriz                  |

|              |                                                                |
|--------------|----------------------------------------------------------------|
| <i>DEFB1</i> | Gene da Defensina beta 1                                       |
| DNA          | Ácido Desoxirribonucleico                                      |
| DP           | Desvio Padrão                                                  |
| <i>ESRRB</i> | Gene do Receptor beta relacionado ao Estrogênio                |
| EUA          | Estados Unidos das Américas                                    |
| FADD         | Domínio Apoptótico do Fator de Necrose Tumoral alfa            |
| FAICTs       | Colágenos Associados a Fibrilas com Tripla Hélice              |
| <i>FGF10</i> | Gene do Fator tipo 10 de Crescimento de Fibroblasto            |
| <i>FGF3</i>  | Gene do Fator tipo 3 de Crescimento de Fibroblasto             |
| <i>FGFR1</i> | Gene do Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblasto tipo 1 |
| G            | Guanina                                                        |
| <i>GDF5</i>  | Gene do Fator 5 de Diferenciação de Crescimento                |
| IC           | Intervalo de Confiança                                         |
| IGF-I        | Fator de Crescimento semelhante a insulina tipo 1              |
| INTO         | Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia                |
| I $\kappa$ B | Subunidade Inibitória do Fator Nuclear kappa B                 |
| JNK          | Quinase N-Terminal da junção C                                 |
| LTB4         | Leucotrieno beta 4                                             |
| MCP          | Morte Celular Programada                                       |
| MEC          | Matriz Extracelular                                            |
| MFA          | Menor Frequência alélica                                       |
| MIR608       | Micro RNA 608                                                  |
| miRNAs       | Micro RNA's                                                    |
| ml           | Mililitro                                                      |
| <i>MMP1</i>  | Gene da Metaloproteinase 1                                     |
| <i>MMP12</i> | Gene da Metaloproteinase 12                                    |
| <i>MMP8</i>  | Gene da Metaloproteinase 8                                     |

|              |                                                               |
|--------------|---------------------------------------------------------------|
| NEMO         | Modulador Essencial do NFκB                                   |
| NFκB         | Fator Nuclear kappa B                                         |
| ng           | Nanograma                                                     |
| NPR          | Razão de rede de Proteína                                     |
| °C           | Graus Celcius                                                 |
| OR           | Razão de Chance (Odds Ratio)                                  |
| p75          | Receptor p75 de neurotrofina                                  |
| PCR          | Reação de Cadeia em Polimerase                                |
| PDGF         | Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas                   |
| PGE2         | Prostaglandina E2                                             |
| RNA          | Ácido Ribonucleico                                            |
| RT-PCR       | Reação de Cadeia em Polimerase em Tempo Real                  |
| SP-1         | Proteína Específica um                                        |
| STREGA       | STengthening the REporting of Genetic Association studies     |
| T            | Timina                                                        |
| <i>TGFB1</i> | Gene do Fator de Necrose Tumoral beta um                      |
| TGF-β        | Fator Transformador do Crescimento tipo Beta                  |
| <i>TNC</i>   | Gene da Tenascina C                                           |
| TNF-R1       | Receptor um de Fator de Necrose Tumoral                       |
| TNF-α        | Fator de Necrose Tumoral tipo alfa                            |
| <i>TNFA</i>  | Gene no Fator de Necrose Tumoral alfa                         |
| <i>TNFR2</i> | Gene do Receptor dois de Fator de Necrose Tumoral             |
| TP           | tendão Tibial Posterior                                       |
| <i>TRADD</i> | Gene do Receptor de TNF Associado ao domínio de morte celular |
| TTP          | Tendinopatia do Tibial Posterior                              |
| TX           | Texas                                                         |
| μl           | Microlitro                                                    |
| <i>VEGF</i>  | Fator de Crescimento Endotelial Vascular                      |

|          |                       |
|----------|-----------------------|
| $\alpha$ | Alfa                  |
| $\beta$  | Beta                  |
| $\chi^2$ | teste do qui-quadrado |

## Lista de Figuras

---

Figura 1. Estrutura de um tendão. Organização em níveis hierarquizados. Detalhe da organização terciária das fibras colágenas.

Figura 2. Esquema da estrutura básica do tendão. A fibrila consiste basicamente de colágeno tipo I.

Figura 3: Modelo de fisiopatologia das tendinopatias proposto por Wu em 2011.

Figura 4: Estrutura esquemática do TNFa.

Figura 5. Mecanismo de ação (simplificado) do Fator de Necrose Tumoral Tipo-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induzindo a apoptose através de TNFR-1.

Figura 6: Esquema da ação da sinalização do TNF- $\alpha$  e no tendão de Aquiles baseada nas funções em outros tecidos.

Figura 7. Anatomia da região medial do tornozelo e pé.

Figura 8. Deformidade em valgo de ambos os pés em paciente portadora de TTP.

Figura 9. Exame físico comparativo entre o lado normal.

Figura 10. Esquema, com base no desenvolvimento da tendinopatia de Aquiles, mostrando a relação complexa entre os fatores de risco internos e externos na etiologia da lesão.

## Lista de Tabelas

---

Tabela 1: Características da população estudada

Tabela 2: Base para o cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 3: Resumo dos achados das regiões estudadas (por alelos)

Tabela 4: Distribuição dos haplótipos nos grupos controle e TTP.

Tabela 5: Detalhamento das análises genômicas dos participantes do grupo TTP

Tabela 6: Detalhamento das análises genômicas dos participantes do grupo Controle

Tabela 7: Estudos correlacionando polimorfismos em um único gene e o risco de desenvolver TTP.

## 1. Introdução

---

A tendinopatia do tibial posterior (TTP), também denominada insuficiência do tibial posterior ou pé plano adquirido do adulto, é uma doença degenerativa insidiosa e progressiva que comumente afeta mais as mulheres após os quarenta anos de idade (MYERSON *et al*, 1996; HADDAD e DELAND *et al*, 2014).

A apresentação clínica mais comum é dor no trajeto do tendão tibial posterior e deformidade em valgo ou “pé plano” associado a graus variados de abdução do antepé. Os sintomas são progressivos e podem ser incapacitantes (HADDAD e DELAND *et al*, 2014).

O diagnóstico é baseado na anamnese e exame físico e complementado com exames de imagem. O sinal patognomônico é o teste da elevação do calcanhar positivo, que consiste no paciente tentar ficar na ponta do pé com apoio monopodal (FUNK *et al*, 1986). Na TTP os pacientes não conseguem realizar a manobra (JOHNSON e STROM, 1989). Grande parte dos pacientes necessita de cirurgia o que dificulta e encarece o tratamento (HADDAD e DELAND *et al*, 2014).

Tendinopatias são doenças multifatoriais (REF). A influência de fatores mecânicos e hormonais foi explorada por diversos autores (HOLMES *et al*, 1992; HOPE e SAXBY, 2007; WU *et al*, 2011). Nos últimos anos, os fatores genéticos têm sido apontados como relacionados às tendinopatias em geral, como do Aquiles (RIBBANS e COLLINS, 2013) e manguito rotador (MOTTA, 2013). Polimorfismos localizados nos genes *COL5A1*, *MIR608*, *COL1A1*, *COL12A1*, *TNC*,

*GDF5*, *CASP8* e *MMP12* foram aplicados como indicadores de susceptibilidade genética às tendinopatias em diferentes populações, incluindo África do Sul, Estados Unidos e Europa (COLLINS *et al*, 2010; SEPTEMBER *et al*, 2012). No Brasil, o estudo de Salles *et al* (2014) foi pioneiro na análise do polimorfismo genético em atletas, mostrando associação de polimorfismos nos genes *BMP4*, *ESRRB* e *FGF3* com a tendinopatia do manguito rotador.

Poucos trabalhos exploraram a característica genética da TTP. Até o momento, somente regiões específicas nos genes *MMP1* e *MMP8* foram analisadas, mostrando associação significativa com o desenvolvimento da doença (GODOY-SANTOS *et al*, 2013; GODOY-SANTOS *et al*, 2014; BARONEZA *et al*, 2014).

Considerando que as tendinopatias são decorrentes de uma combinação de fatores extrínsecos e intrínsecos, e que, a degeneração do tendão ocorre principalmente por apoptose dos tenócitos, devido à presença de radicais livres que desencadeiam a ativação de moléculas indutoras de morte celular (YUAN, *et al* 2002; NELL *et al*, 2012), estudos envolvendo citocinas relacionadas com apoptose celular poderão contribuir para o melhor entendimento do perfil genético relacionado a fisiopatologia da TTP. Acredita-se que métodos futuros, para aprimoramento de diagnóstico ou tratamento de doenças do sistema musculoesquelético, poderão basear-se nas características genéticas do indivíduo (SAKABE *et al*, 2011).

## 2. Revisão da Literatura

---

### 2.1. Estrutura e Fisiologia dos Tendões

O tendão é um tecido conjuntivo denso composto primariamente por fibras de colágeno, proteoglicanos e água (SHARMA e MAFFULLI, 2006; XU *et al*, 2008). Morfologicamente, tem o aspecto de um cordão fibroso branco perolado, bem organizado, composto por feixes paralelos de fibras de colágeno que ligam o músculo ao osso, transmitindo força e absorvendo impactos (WANG *et al*, 2006).

Os proteoglicanos e as proteínas não colágenas dos tendões atuam na regulação do tamanho das fibras e fibrilas de colágeno e de outros componentes da matriz e na mediação de interações célula-matriz. Essa composição é responsável pelas propriedades elásticas e viscoelásticas do tecido tendíneo (FESSEL *et al*, 2009). Por isso, os tendões possuem alta capacidade de alterar seu metabolismo, em resposta a cargas mecânicas, aumentando a síntese de colágeno tipo I e forças tencionais. No entanto, os mecanismos pelos quais as células percebem o estresse mecânico e o converte em sinais bioquímicos adaptativos não é bem conhecido (WANG *et al*, 2006).

Como na maioria dos tecidos, a matriz extracelular dos tendões é altamente sensível às ações das células e é frequentemente remodelada por estas durante o desenvolvimento, a homeostase e a regeneração tecidual, por meio de digestão enzimática seguida da deposição de matriz recém-sintetizada. Este processo além de prover ancoragem e arcabouço mecânico para a

renovação tecidual tem um importante papel na regulação da morfologia, na diferenciação, migração e nas funções metabólicas celulares dos tendões (WU *et al*, 2011).

A origem da força tendínea reside na organização das fibras de colágeno que correm paralelas, em agregados orientados longitudinalmente, e das ligações cruzadas entre as fibras, que distribuem as cargas e evitam os danos causados pela concentração de estresse em um único ponto do tecido (WANG *et al*, 2006; FESSEL *et al*, 2009).

A estrutura do tendão é organizada em níveis hierarquizados. Essa composição assegura que pequenos danos não se espalhem ao longo do tecido, além de aumentar a força do tendão. O primeiro nível é composto por moléculas de colágeno, o seu principal componente. Neste nível as moléculas se agregam e forma o segundo nível hierárquico, as fibrilas de colágeno, que se dispõem paralelamente (SHARMA e MAFFULLI, 2006). As fibrilas se unem e formam as fibras, circundadas pelo endotendão: uma fina camada de tecido conjuntivo que contém vasos sanguíneos, linfáticos e fibras nervosas. A estrutura terciária fibrilar constitui o nível máximo de compactação das fibras (WANG *et al*, 2006) (Figura1).

Acredita-se que as fibras elásticas, que constituem de 1 a 2% da massa do tecido, sejam responsáveis pelo retorno das fibras à posição inicial (KANNUS, 2000). A extensão das fibras acarreta em perda temporária da ondulação, devido ao deslizamento das hélices triplíces de colágeno, tornando as fibras paralelas. Até certo ponto, as propriedades viscoelásticas permitem ao tendão retornar ao estado de repouso. Quando as cargas são intensas, ocorrem micro-rupturas que

levam ao aumento da produção local de prostaglandinas E tipo 2 (PGE2) e leucotrienos tipo B4 (LTB4) (WANG *et al*, 2006). Cargas extremas provocam lesão macroscópica com consequente produção de proteoglicanos E2 e leucotrienos tipo B que induzem a e ruptura do tendão, no fim da cascata (SHARMA e MAFFULLI, 2006).

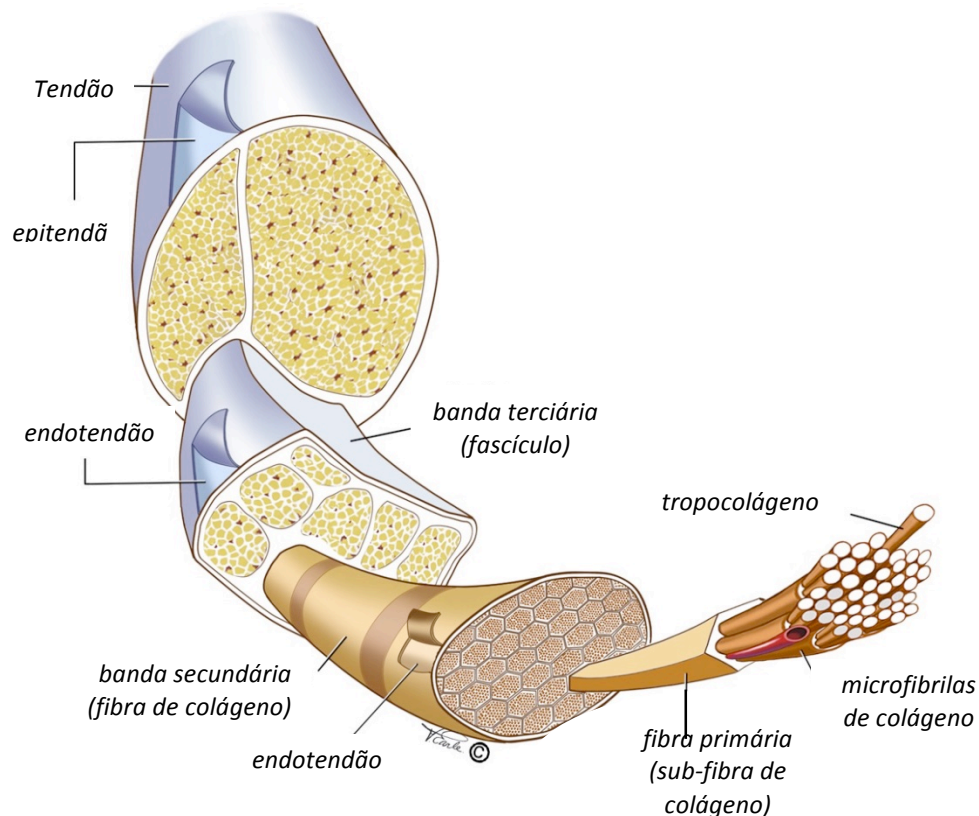


Figura 1. Estrutura de um tendão. Organização em níveis hierarquizados. Detalhe da organização terciária das fibras colágenas. Modificado de <http://vearlemedicalart.com> sob autorização.

As cargas mecânicas desempenham um importante papel na organização tecidual desde o estágio de fibrilas aos agregados de fibras (KOVACEVIC e RODEO, 2008) e também na fisiologia tendínea (SAKABE *et al*, 2011). Os tendões respondem a estímulos de cargas modificando sua estrutura, composição e propriedades mecânicas. Tais mudanças são realizadas pelos fibroblastos, que alteram a expressão das proteínas da matriz (WANG *et al*, 2006).

Os proteoglicanos presentes no tendão ligam-se às fibrilas de colágeno tipo I através de seu núcleo protéico e mediam a organização ultraestrutural do tecido, sendo responsáveis principalmente pela resistência a cargas (FESSEL e SNEDEKER, 2009).

O colágeno é uma proteína essencial para o tendão, pois provê integridade estrutural, contribui para a força mecânica do tecido e constitui cerca de 60% de seu peso seco. O tipo mais abundante é o colágeno tipo I que responde por aproximadamente 95% da quantidade total de colágeno; os 5% restantes são representados pelos colágenos tipos II, III, V, VI, IX, X, XI, XII e XV (SHARMA e MAFFULLI, 2006; TAYLOR *et al*, 2009). O colágeno tipo III encontra-se predominantemente no endotendão e no epitendão, sob a forma de fibras pequenas e desorganizadas, que podem ocasionar redução da força mecânica (WANG *et al*, 2006). O colágeno tipo V é intercalado com um núcleo de fibrilas de colágeno tipo I e regula o crescimento fibrilar (COLLINS, 2010) (Figura 2).

Além do colágeno tipo I, a matriz extracelular dos tendões é composta por diversas glicoproteínas; algumas são essenciais como a tenascina C, a fibronectina e a elastina (SHARMA e MAFFULLI, 2006).

A tenascina C está presente em todo o tecido tendíneo especialmente nas junçõesmiotendinosas e osteotendinosas (SHARMA e MAFFULLI, 2006). Tem papel na orientação e alinhamento das fibras de colágeno e, acredita-se, que possa ter um papel na contração de feridas. Sua expressão é regulada por cargas mecânicas e está aumentada nas tendinopatias (TAYLOR *et al*, 2009).

A fibronectina auxilia na cicatrização tecidual e localiza-se na superfície das fibrilas colágenas. Já a elastina, que responde por cerca de 2% do tecido, auxilia no retorno das fibras ao modelo ondulado após extensão devido a exposição a cargas mecânicas (WANG *et al*, 2006).

A Proteína Oligomérica de Matriz da Cartilagem (COMP - *Cartilage Oligomeric Matrix Protein*) encontrada também na cartilagem é uma glicoproteína pentamérica abundante na matriz extracelular do tendão (CROVACE *et al*, 2010). A COMP está envolvida com a fibrilogênese de colágeno e permite que o tendão adapte-se às diferentes necessidades mecânicas (TAYLOR *et al*, 2009).

O tecido tendíneo comporta dois tipos celulares: os tenoblastos e os tenócitos, que respondem por cerca de 90-95% de todo conteúdo celular do tecido. O restante (5-10%) é composto por condrócitos nos locais de inserção e adesão óssea, células sinoviais da camada tendínea e células vasculares, tais como células endoteliais e células de músculo liso presentes nas paredes das arteríolas (WANG *et al*, 2006). As células progenitoras tendíneas situam-se entre os agregados fibrilares, assim como os tenócitos e os tenoblastos (SAKABE *et al*, 2011).

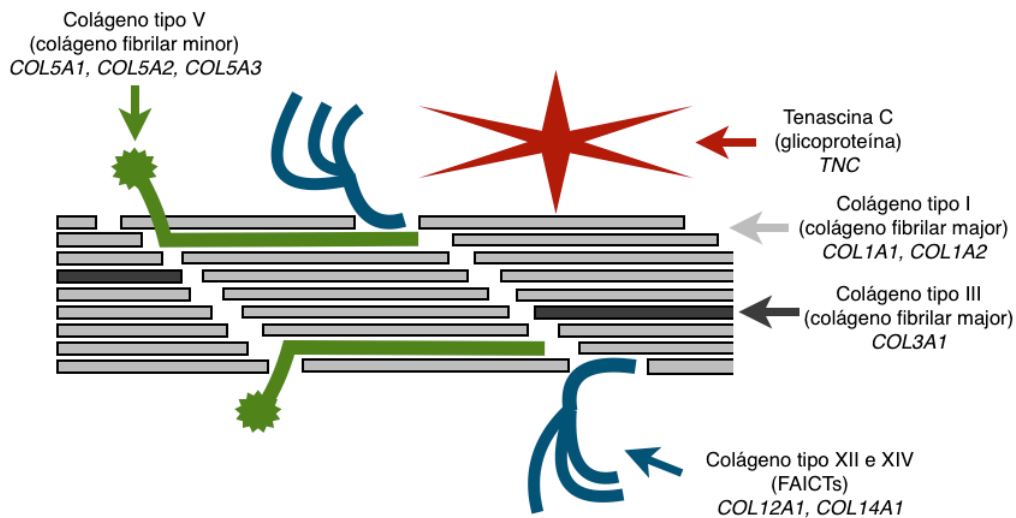


Figura 2. Esquema da estrutura básica do tendão. A fibrila consiste basicamente de colágeno tipo I, que é um heterodímero consistindo de duas cadeias (alfa 1 e alfa 2), as são codificadas pelos genes *COL1A1* e *COL1A2*, respectivamente. As fibrilas também contêm quantidades expressivas de colágeno tipo III e V. O colágeno tipo III é formado por três cadeias alfa 1 codificadas pelo gene *COL3A1*. A maior isomorfa do colágeno tipo V é um heterodímero consistindo de duas cadeias alfa 1 e uma cadeia alfa 2, codificadas pelos genes *COL5A1* e *COL5A2*, respectivamente. Algumas isomorfos contêm a cadeia alfa 3 codificada pelo gene *COL5A3*. Os colágenos XII e XIV estão associados com a superfície fibrilar e pertence à subfamília de colágenos associados a fibrilas com tripla hélice (FAICTs do inglês *fibril-associated collagens with interrupted triple helices*). Ambas as proteínas são homotrímeros codificados pelos genes *COL12A1* e *COL14A1*. A glicoproteína Tenascina C é codificada pelo gen *TNC*. Modificado de Collins e Raleigh (2009).

A Proteína Oligomérica de Matriz da Cartilagem (COMP - *Cartilage Oligomeric Matrix Protein*) encontrada também na cartilagem é uma glicoproteína pentamérica abundante na matriz extracelular do tendão (CROVACE *et al*, 2010). A COMP está envolvida com a fibrilogênese de colágeno e permite que o tendão adapte-se às diferentes necessidades mecânicas (TAYLOR *et al*, 2009).

O tecido tendíneo comporta dois tipos celulares: os tenoblastos e os tenócitos, que respondem por cerca de 90-95% de todo conteúdo celular do tecido. O restante (5-10%) é composto por condrócitos nos locais de inserção e

adesão óssea, células sinoviais da camada tendínea e células vasculares, tais como células endoteliais e células de músculo liso presentes nas paredes das arteríolas (WANG *et al*, 2006). As células progenitoras tendíneas situam-se entre os agregados fibrilares, assim como os tenócitos e os tenoblastos (SAKABE *et al*, 2011).

As células tendíneas tem um potencial limitado de multiplicação, o que explica sua baixa capacidade em promover a regeneração (HOPE e SAXBY, 2007; SCHULZE-TANZIL *et al*, 2011). Os tenócitos respondem pela síntese de proteínas da matriz, como colágenos, fibronectina e proteoglicanos, proteínas mediadoras do reparo e produção de matriz extracelular organizada e remodelamento durante os processos de regeneração (HOPE e SAXBY, 2007). Já os tenoblastos são células tendíneas imaturas com morfologia fusiforme e alta atividade metabólica. Com a idade, os tenoblastos tornam-se alongados e transformam-se em tenócitos. Os tenócitos possuem menor atividade metabólica e menor relação núcleo-citoplasma (SHARMA e MAFFULLI, 2006).

O baixo consumo de oxigênio por tendões e ligamentos (cerca de sete vezes menor do que no músculo esquelético), a consequente baixa taxa metabólica aliada a uma boa capacidade de geração de energia, tornam esses tecidos capazes de suportar cargas e manter tensões por grandes períodos de tempo sem que ocorra isquemia e subsequente necrose. Embora seja um fator positivo para a função tecidual, a baixa taxa metabólica torna os processos regenerativos do tendão extremamente lentos (SHARMA e MAFFULLI, 2006).

## 2.2 Tendinopatias

A patogênese das tendinopatias não está clara. Corps, em 2012, sugeriu como causa possível da TTP, que mediadores biomecânicos sejam produzidos primariamente pelos tenócitos, em resposta ao estresse.

As tendinopatias ocorrem quando os tendões são submetidos a altos níveis de estresse mecânico e/ou pelo acúmulo de microtraumas e distribuição irregular de carga (WU *et al*, 2011) (figura 3). Em geral, os traumas tendíneos se relacionam com carga tênsil excessiva podendo resultar em laceração ou contusão (HOPE e SAXBY, 2007). Na TTP isso tem especial importância visto que o tendão tibial posterior possui no seu trajeto uma angulação excessiva na região adjacente ao maléolo medial que o coloca em extrema tensão durante a marcha (HADDAD e DELAND, 2014).

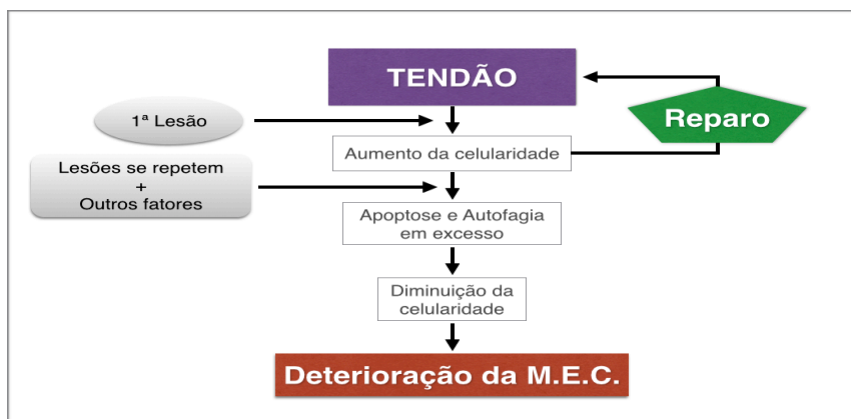


Figura 3: Modelo de fisiopatologia das tendinopatias proposto por Wu em 2011. MEC: Matriz Extra-Celular.

Histologicamente, a tendinopatia é caracterizada por degeneração e desorganização das fibras de colágeno (WANG *et al*, 2006). Macroscopicamente, se apresenta como uma degeneração mucóide, com o tecido friável e de cor

acastanhada (GONÇALVES-NETO *et al*, 2002). Microscopicamente, confirma-se que esta estrutura apresenta desorganização e micro-ruptura das fibras de colágeno, hiper celularidade com arredondamento dos núcleos (SATOMI *et al*, 2008), aumento significativo de colágeno tipo III, IV e V em relação a quantidade de colágeno tipo I, aumento da quantidade de glicosaminoglicanos, neovascularização e apoptose (JAFARI *et al*, 2015). Outras características patológicas comumente presentes são as adiposes, fibrocartilaginoses e metaplasias ósseas. Além dessas alterações morfológicas, pode-se observar um aumento da produção de glutamato e os altos níveis do neurotransmissor excitatório glutamato estão relacionados com a sensação dolorosa (RILEY, 2008).

Após uma lesão, há uma alta expressão de IGF-I (fator de crescimento semelhante a insulina tipo-1), que na fase inflamatória promove proliferação e migração de fibroblastos tendíneos e subsequente aumento na produção de colágeno e proteoglicanos; PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), que estimula a produção de outros fatores de crescimento e mitogênicos; TGF- $\beta$  (fator transformador do crescimento tipo beta), que auxilia a deposição de matriz); VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), que, na fase reparativa, estimula proliferação de células endoteliais, aumenta a permeabilidade capilar e a angiogênese; e o FGF-b (fator de crescimento fibroblástico básico), que promove angiogênese e regula a proliferação e a migração celular. Após a injúria, a expressão de colágeno I inicialmente é reduzida e então retorna gradualmente ao nível inicial, por volta do dia 28; enquanto a expressão dos colágenos III, V e XII é aumentada (WANG *et al*, 2006; RILEY, 2008).

Surpreendentemente, não se confirma a presença de células inflamatórias em amostras colhidas tanto em humanos quanto em modelos experimentais. Portanto, as tendinopatias são condições degenerativas e não inflamatórias (RILEY, 2008).

Os fatores constituintes da lesão podem ser intrínsecos ou extrínsecos . Os fatores intrínsecos estão relacionados com a função exercida, idade, força muscular, flexibilidade, irrigação peculiar, atrito e compressões contra estruturas adjacentes e com o trajeto anatômico e suas alterações (HOLMES, 1992; XU e MURRELL, 2008). Já os fatores extrínsecos estão relacionados às doenças sistêmicas, tabagismo, erros no treinamento, influência hormonal, utilização de antibióticos e principalmente às atividades por esforços repetitivos (RIBBANS e COLLINS, 2013; XU e MURRELL, 2008).

A regeneração do tecido tendíneo é um processo lento e frequentemente acarreta na formação de tecido cicatricial, com propriedades biomecânicas inferiores às do tecido original, ou adesões fibrosas que aumentam o risco de reincidência da lesão após o tratamento (HOPE e SAXBY, 2007).

A baixa capacidade regenerativa dos tendões é devido ao pequeno número de tenócitos, que são as únicas células tendíneas responsáveis pela produção, deposição, organização e manutenção da matriz extracelular (HOPE e SAXBY, 2007) e à vascularização limitada com baixa atividade mitótica (RILEY, 2008).

O processo de regeneração tendíneo, que ocorre em resposta a uma agressão, pode ser dividido em três etapas, que se sobrepõem (HOPE e SAXBY, 2007). A fase inflamatória inicial ocorre logo após a agressão. Há um aumento

local de plaquetas, eritrócitos e células inflamatórias (macrófagos, monócitos e neutrófilos) que fagocitam os restos necróticos e liberam fatores vasoativos e quimiotáticos, que recrutam fibroblastos para iniciar a síntese e a deposição de colágeno (SAKABE e SAKAI, 2011). Nas primeiras 24 horas, há um predomínio de monócitos e macrófagos e a ocorrência de fagocitose do material necrótico. Devido ao aumento da permeabilidade vascular, há liberação de fatores vasoativos e quimiotáticos, início da angiogênese, estimulação da proliferação de tenócitos e maior recrutamento de células inflamatórias. Há migração de tenócitos para o local da lesão e início da síntese de colágeno III.

A fase reparativa/proliferativa, que é intermediária do processo de reparo, se inicia alguns dias após a agressão e dura aproximadamente seis semanas. Nesta etapa há abundância de síntese, pelos fibroblastos tendíneos, de componentes da matriz, como colágeno e proteoglicanos e sua deposição no local da lesão (HOPE e SAXBY, 2007). As concentrações de água e glicosaminoglicanos permanecem altas, assim como de colágeno III.

A fase remodeladora tem início cerca de seis semanas após a agressão, é caracterizada pela diminuição da celularidade e redução da síntese de colágeno e glicosaminoglicanos. O tecido reparado se transforma em um tecido fibroso cicatricial após cerca de 10 semanas. Na etapa mais tardia desta fase, as ligações covalentes entre as fibras aumentam, resultando em um tecido com maior firmeza e maior força tênsil. A vascularização e o metabolismo dos tenócitos diminuem progressivamente, há um alinhamento das fibras e dos tenócitos na direção do tecido tendíneo e a síntese de colágeno I permanece alta (WANG *et al*, 2006).

Durante a tradução do sinal mecânico no tendão, as citocinas desenvolvem função primordial na cascata de sinalização. Os tenócitos respondem de forma adaptativa à presença de carga por meio de citocinas, tais como TNF- $\alpha$  e seus receptores (TNF-R1 e TNFR-2) (SCHULZE-TANZIL *et al*, 2011; FUCHS e STELLER, 2014).

### 2.3 O Fator de Necrose Tumoral Tipo alfa (TNF- $\alpha$ ) nas Tendinopatias

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica produzida por vários tipos celulares como: macrófagos, mastócitos, células linfóides, células endoteliais, células do miocárdio, tecido adiposo, fibroblastos e tecido neural (FUCHS e STELLER, 2014). Seu gene (*TNFA*) está localizado no cromossomo seis e é constituído por quatro exons e três introns. Os exons I e II contêm a sequência peptídica líder (PARAMESWARAN *et al*, 2010) (Figura 4).



Figura 4: O TNF- $\alpha$ . A -; B - Estrutura tridimensional do TNF- $\alpha$ . Fonte: "TNFa Crystal Structure.rsh" por Ramin Herati. Licenciado sob domínio público, via Wikimedia Commons.

O TNF- $\alpha$  age através de dois receptores transmembranares: O TNF receptor 1 (TNFR1) e o TNF receptor 2 (TNFR2). O TNFR1 é expresso na maioria dos tecidos de mamíferos, enquanto a expressão do TNFR2 é altamente regulada e tipicamente expressa nas células do sistema imune (PARAMESWARAN *et al*, 2010).

A ligação do TNF- $\alpha$  com seus receptores ativa três principais cascatas de sinalização (FUCHS e STELLER, 2014). A primeira, uma cascata necroptótica, é iniciada quando o complexo TNF-receptor se associa ao domínio do receptor associado à morte (TNF *receptor-associated death domain* - TRADD). Isso resulta na subsequente ativação da caspase-10, que é uma cisteína-protease capaz de clivar substratos celulares, levando a danos celulares específicos (PARAMESWARAN *et al*, 2010; FUCHS e STELLER, 2014).

A segunda cascata é a via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), que se inicia quando a fosforilação da sua subunidade inibitória (I $\kappa$ B) via NEMO (modulador essencial do NF $\kappa$ B) ocorre, o que leva à dissociação e eventual degradação do I $\kappa$ B (PARAMESWARAN *et al*, 2010).

A terceira cascata é a da via JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), a ativação desta via pode resultar no aumento da atividade de diversos fatores de transcrição, que inclui a proteína ativadora 1 (AP-1) e a proteína específica 1 (SP-1). Esses fatores de transcrição podem regular a expressão gênica positivamente ou negativamente, dependendo do perfil de expressão dos cofatores e da composição dos sítios de ligação nas regiões promotoras dos genes alvo (PARAMESWARAN *et al*, 2010).

O receptor TNF-R1 tem a capacidade de sinalizar a morte celular por meio de seu domínio apoptótico (FADD) que recruta e se liga a proteína Fas, promovendo subsequente clivagem e ativação da caspase-10 (FUCHS e STELLER, 2014). A caspase-10 clivada/ativada tem a capacidade de ativar as caspases seguintes, tais como caspase-3, por clivagem direta. Indiretamente, a caspase-10 estimula a clivagem de BID (*BH3 interacting-domain death*) através do domínio Bcl-2, induzindo a liberação do citocromo C.23. No final do estágio apoptótico, quando o DNA é fragmentado, a polimerase ribossômica é clivada (c-PARP). PARP é uma proteína envolvida no reparo do DNA, mas sua função é inativada pela clivagem, contribuindo para a apoptose (BACKMAN *et al*, 2014) (Figura 5).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina envolvida na sinalização da MCP tipo necroptose através do receptor TNF-R1 (FUCHS e STELLER, 2014) e aumento significativo de MCP foi demonstrada em tendinopatias do patelar (LIAN *et al*, 2007) e calcâneo (GAIDA, 2012), mas não foi replicada *in vitro* (SCHULZE-TANZIL *et al*, 2011).

Aydin *et al*, em 2010, observaram uma regressão de sinais ultrassonográfico de tendinopatia do calcâneo em pacientes submetidos a terapia com antagonistas do TNF- $\alpha$ , o que claramente sinaliza que existe algum papel desta citocina no desenvolvimento do quadro patológico.

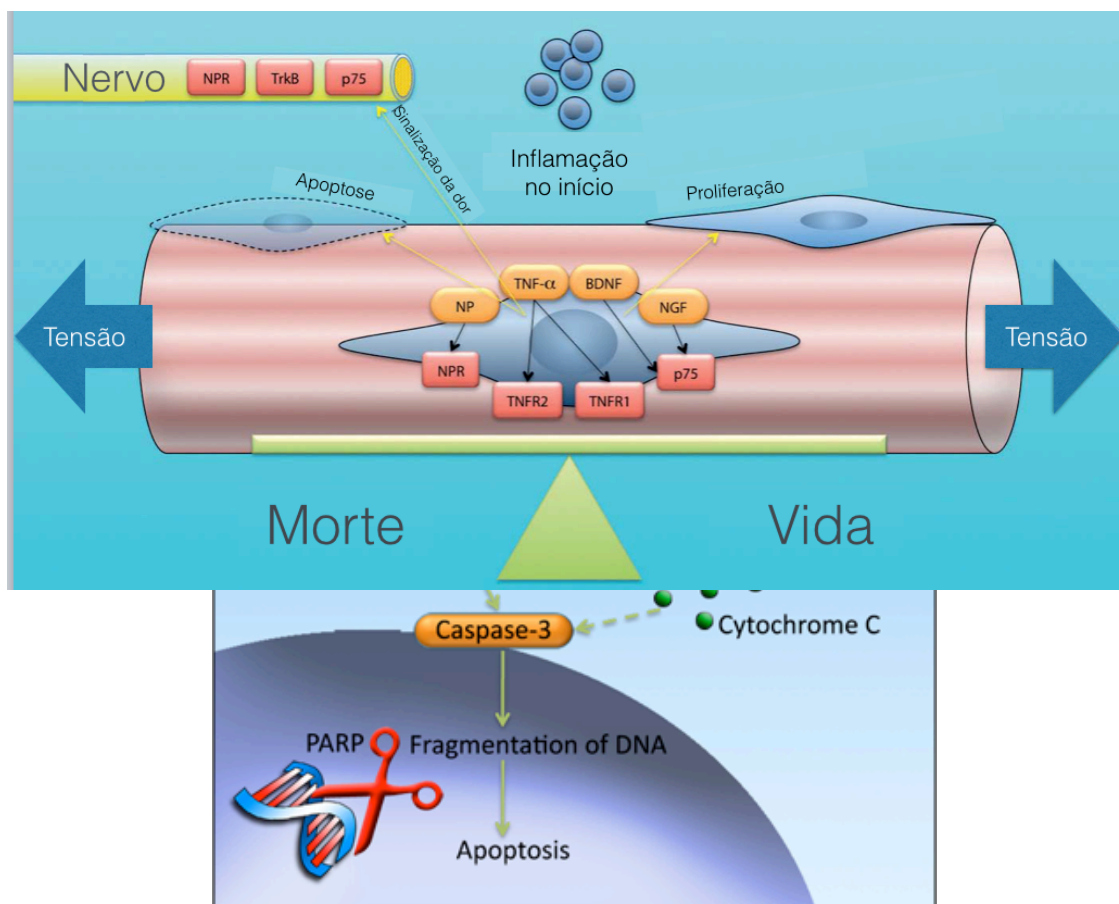


Figura 5. Mecanismo de ação (simplificado) do Fator de Necrose Tumoral Tipo-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induzindo a apoptose através de TNFR-1. TNF- $\alpha$  quando se liga a TNFR-1 resulta na ativação da Caspase-10 através do recrutamento de FADD. A caspase-10 ativada tem a capacidade de ativar a Caspase-3, por clivagem direta, ou indiretamente pela ativação de BID, liberando o citocromo C que ativará a Caspase-3. Esta Caspase-3 ativada promoverá a fragmentação do DNA, característico da apoptose, com envolvimento da clivagem de PARP (poly-ADP ribosome polymerase) (BACKMAN *et al*, 2014)

## 2.4 A Tendinopatia do Tibial Posterior (TTP)

A TTP, também denominada Pé Plano Adquirido do Adulto, foi primeiramente descrita por Kulowski (1936). A partir da década de oitenta esta síndrome ganhou mais espaço na literatura ortopédica. Principalmente após os trabalhos de Johnson e Strom (1989) - os primeiros a discutir e sistematizar os sinais e sintomas.

O músculo tibial posterior (TP) localiza-se no compartimento posterior

profundo da perna e tem origem no terço proximal da tíbia e membrana interóssea (MYERSON, 1996). Seu tendão se prolonga posteriormente à tíbia e adjacente ao maléolo medial onde faz uma mudança aguda de direção (Figura 6). Nesta região, o TP não possui mesotendão, o que deixa a porção do tecido relativamente hipovascularizada (GOLANÓ *et al*, 2010). Além disso, é uma zona de estresse mecânico uma vez que há maior atrito entre o TP e as estruturas adjacentes. A partir desta zona o TP se prolonga para as suas múltiplas inserções no mediopé, a principal delas se na tuberosidade do navicular. O TP é um estabilizador dinâmico do retropé durante a marcha (BLUMAN *et al*, 2007).

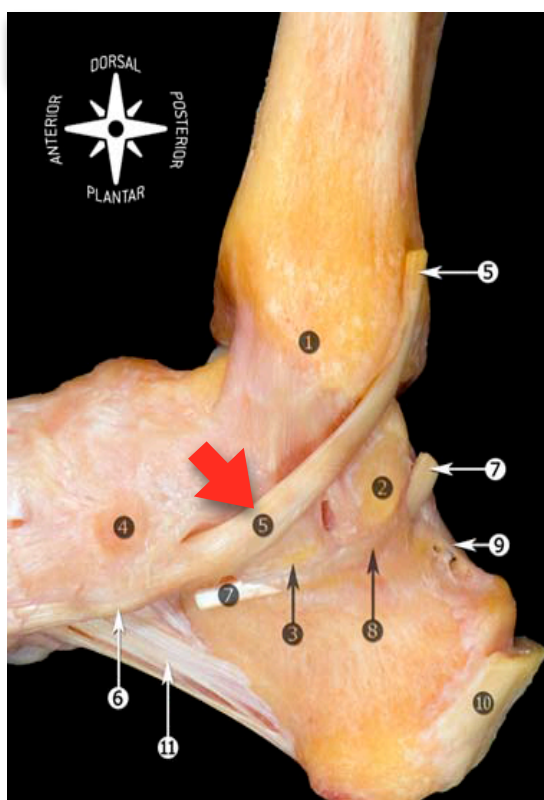


Figura 6. Anatomia da região medial do tornozelo e pé: (1) maléolo medial; (2) processo lateral do talus; (3) sustentáculo do talus; (4) navicular; (5) tendão tibial posterior (seta vermelha); (6) processo medial do navicular; (7) tendão flexor longo do hálux (FLH); (8) retináculo do tendão do flexor longo do hálux; (9) ligamento talocalcaneano posterior; (10) tendão calcâneo; (11) ligamento plantar longo. (GOLANÓ *et al*, 2010)

A deformidade progressiva em valgo do retropé é notada na ectoscopia posterior; quando associada à abdução do antepé temos o sinal *too many toes*. No pé afetado pode-se ver mais dedos do que o pé normal (Figura 8) (JOHNSON e STROM, 1989) (Figura 8). O sinal patognomônico da TTP é a incapacidade da(o) paciente de iniciar o movimento de ficar na ponta do pé no apoio monopodal; Sinal da ponta de pé positivo (FUNK *et al*, 1986) (Figura 9).



Figura 8. Deformidade em valgo de ambos os pés em paciente portadora de TTP. Nota-se também que os dedos laterais são vistos pelo examinador estando a paciente de costas, Sinal dos dedos em excesso (*too many toes*). Foto de uma participante do grupo TTP (sob autorização).



Figura 9. Exame físico comparativo entre o lado normal (A) e o acometido de TTP (B) na mesma paciente. No lado afetado (B) a paciente não consegue realizar a elevação do calcanhar com apoio monopodal. Foto de uma participante do grupo TTP (sob autorização).

## 2.5 Herança Genética e Tendinopatias

As doenças degenerativas ortopédicas, de forma geral, seguem um modelo etiológico semelhante. A combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos produz uma predisposição ou indício de susceptibilidade, desencadeando uma resposta aguda por herança multifatorial, como por exemplo injúria do ligamento cruzado anterior ou ruptura do tendão calcâneo, ou condições crônicas como as tendinopatias (Figura 10) (RIBBANS e COLLINS, 2013).

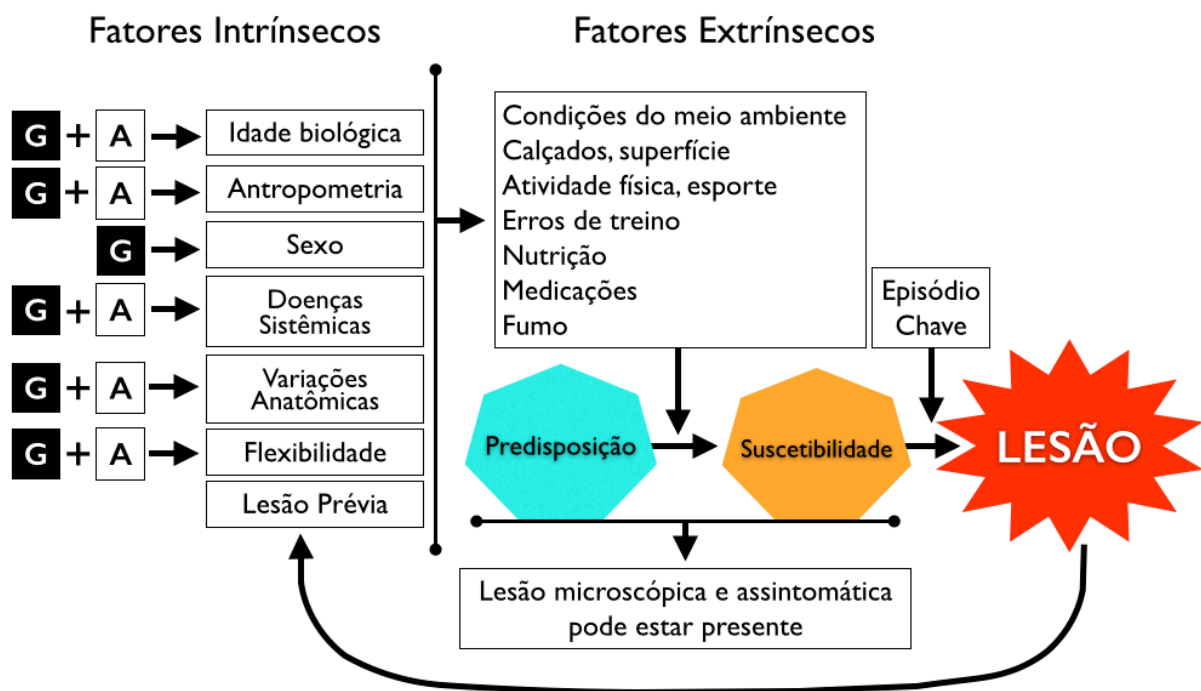


Figura 10. Esquema, com base no desenvolvimento da tendinopatia de Aquiles, mostrando a relação complexa entre os fatores de risco internos e externos na etiologia da lesão. Muitos dos fatores intrínsecos de risco são caracterizados por fenótipos multifatoriais, determinados por ambos: genética e ambiente. G: fator genético / A: fator ambiental). Adaptado de Ribbans e Collins (2013).

A maioria dos fatores intrínsecos para os aspectos do sistema musculoesquelético, se não todos, tem um componente genético (TUCKER e COLLINS, 2012). Por exemplo, a altura é determinada por ambos os fatores, genéticos e ambientais, com sua hereditariedade poligênica estimada de 80% (COLLINS, 2010). Recentes estudos exploram a característica genética individual, baseando-se na presença de polimorfismos, como forma de entender a fisiopatologia das tendinopatias (MOTTA *et al*, 2013; SALLES *et al*, 2015; NELL *et al*, 2012).

Polimorfismo é a ocorrência de múltiplos alelos num locus (local ocupado por um gene num cromossomo), no qual pelo menos um alelo (gene correspondente de dois cromossomos homólogos) aparece em pelo menos 1% da

população (NUSSBAUM *et al*, 2008). Loci polimórficos são convencionalmente aqueles para os quais pelo menos 2% da população é heterozigoto. Sendo assim, é considerada a hipótese de que algum fator seletivo atuou sobre aquele sistema genético, levando ao aumento da frequência do alelo anômalo (ZITZMANN *et al*, 2008). Os polimorfismos são elementos chaves na pesquisa e na prática da genética humana, eles são as bases para os esforços contínuos a fim de fornecer a medicina personalizada do futuro (NUSSBAUM *et al*, 2008).

Alguns polimorfismos alteram a expressão de um gene e causam um efeito no fenótipo do indivíduo, conferindo suscetibilidade para doenças. Evidências científicas sugerem que genes específicos podem determinar em qual grau cada resposta imune individual será protetora ou destrutiva. Com as técnicas de DNA recombinante, é possível detectar os polimorfismos que consistem geralmente em uma simples troca de base, deleções ou inserções casuais, ou na presença de números variáveis de cópias repetidas de um determinado fragmento de DNA (repetições em tandem) (NUSSBAUM *et al*, 2008).

O número de genes envolvidos e a contribuição de cada gene para o fenótipo final determinam a diferença entre o polimorfismo genético e a mutação. As alterações genéticas nas quais não ocorre uma compensação do sistema biológico, resultando em um efeito genético são denominadas mutação, diferentemente do polimorfismo (NUSSBAUM *et al*, 2008).

Para entender a importância de cada alelo polimórfico, é necessário avaliar a contribuição de cada polimorfismo no fenótipo da doença (MAGRA e MAFFULLI, 2007). Mokone (2005) demonstrou que o polimorfismo no gene alfa 1 do colágeno tipo V (*COL5A1*) está associado com sintomas de patologias do tendão calcâneo, onde o alelo A2 parece exercer um papel protetor. O mesmo grupo de

pesquisadores comprova também o papel da tenascina-C nesse processo. A análise do polimorfismo no gene da tenascina-C, caracterizado pela repetição de guanina-timina (GT), indica que os indivíduos com 12 e 14 repetições GT, no gene *TNC*, apresentam um risco seis vezes maior de desenvolver lesões no tendão calcâneo.

Um polimorfismo na cadeia alfa 1 do colágeno tipo I (GT) está associado a rupturas do ligamento cruzado anterior (POSTHUMUS *et al*, 2009), mas, não, com lesões de tendão calcâneo (POSTHUMUS *et al*, 2010). Collins e Raleigh (2009) relatam que o polimorfismo do gene *COL5A1* está associado às doenças crônicas do tendão calcâneo.

Posthumus em 2010 comparou os genótipos em pacientes com tendinopatia do calcâneo versus pacientes normais, sendo o principal achado que indivíduos que carregam polimorfismo do gene que expressa o fator transformador de crescimento beta 1 (*TGF- $\beta$ 1*), variante rs1800469 e o fator 5 de diferenciação de crescimento (*GDF-5*), variante rs143383, apresentam o dobro de risco para desenvolver a lesão. O estudo de Motta em 2013 concretizou a influência de polimorfismos nos genes *DEFB1*, *ESRRB*, *FGF3*, *FGF10*, e *FGFR1* no risco de desenvolvimento de lesão do manguito rotador, em 410 indivíduos brasileiros. As revisões sistemáticas de Ribbans e Collins (2013) e Riley (2008) demonstraram o papel de diversos genes no desenvolvimento de tendinopatias em humanos.

Jones (2006) relacionou o perfil de expressão de metaloproteinases em indivíduos com ruptura aguda e tendinopatia do Aquiles, comparado com tendões normais. Foi observado que o perfil de expressão de diversos marcadores genéticos era distinto entre os três grupos.

A Tendinopatia do Tibial Posterior é uma doença cujo caráter genético foi

pouco explorado. Apenas alguns estudos relacionaram polimorfismos ao desenvolvimento desta tendinopatia (GODOY-SANTOS *et al*, 2013; GODOY-SANTOS *et al*, 2014; BARONEZA *et al*, 2014).

Esse conjunto de achados nos leva a acreditar que também exista algum polimorfismo, especialmente do gene *TNFA*, relacionado à TTP.

### 3. Objetivos

---

Avaliar a correlação entre a tendinopatia do tibial posterior e polimorfismos no gene *TNFA*.

Avaliar correlação entre haplótipos das regiões no *TNFA* estudadas e a ocorrência da tendinopatia do tibial posterior.

#### 4. Material e Métodos

---

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia sob o número 548.539 de 26/02/2014 (Anexo I). Todos os participantes foram encorajados a participar na pesquisa, e através de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II) específico para o estudo e devidamente assinado autorizaram formalmente a coleta de amostras.

##### 4.1. Participantes

De janeiro de 2004 a março de 2015 foram operados ou incluídos na fila de cirurgia 258 pacientes com diagnóstico de pé plano causado por TTP (211 mulheres e 16 homens). Destes, 79 foram selecionados para participação na pesquisa, pois preencheram todos os critérios de inclusão (grupo TTP):

1. Gênero feminino;
2. Dor no trajeto do tendão tibial posterior;
3. Deformidade progressiva em valgo do retropé, isto é, pé plano adquirido;
4. Teste da ponta-do-pé positivo, isto é, incapacidade para iniciar o movimento de ficar na ponta do pé acometido com apoio monopodal;
5. Compareceram para consultas de acompanhamento ou específicas para o estudo.

Todos os participantes do Grupo TTP foram examinados por um especialista *senior* em cirurgia do pé e tornozelo.

O grupo controle foi composto por indivíduos sem histórico de TTP, pareados pelo sexo e pela idade. Todos tinham acima de 40 anos e foram examinados, apresentando o teste “ponta-do-pé” negativo, além da ausência de dor no trajeto do tendão ou deformidade adquirida em valgo do retropé (Anexo III - ficha clínica).

Foram excluídos da pesquisa (teste e controle) os indivíduos que apresentarem qualquer uma das seguintes características:

- I. Ser portador de diabetes mellitus há mais de cinco anos;
- II. Ter sido submetido a quimioterapia ou radioterápicos nos últimos dez anos;
- III. Diagnóstico de síndrome genética prévia (Ehler-Danlos, Down etc.);
- IV. Doença endócrina prévia (Hashimoto, Acromegalia, etc.);
- V. Doença reumatológica ou imunológica;
- VI. Doença neurológica com comprometimento motor dos membros inferiores;
- VII. Presença de rigidez com diagnóstico de coalizão tarsal nos pés.

#### 4.2 Análise do Polimorfismo Genético

Os 248 pacientes incluídos no estudo foram orientados a bochechar 5 ml de soro fisiológico estéril, movendo a língua em direção aos dentes e à bochecha, de forma a deslocar células da mucosa, e descartar o conteúdo em um recipiente, para posterior congelamento imediato a -20°C. O DNA genômico foi obtido conforme descrito anteriormente (KUCHLER, 2012). O espectofotômetro (Nanodrop® 1000, Thermo Scientific, Wilmington, EUA) determinou a quantidade e a pureza do DNA. A concentração de DNA foi avaliada em um

comprimento de onda de 260nm. Apenas as amostras de DNA que apresentaram relação A260nm/A280nm maior que 1.9 foram utilizadas. As regiões polimórficas no gene *TNFA* (Tabela 2) foram selecionadas de acordo com o registro do banco de dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), apresentando menor frequência alélica menor do que 0,25.

A genotipagem foi realizada a partir da reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) (LineGene 9660, Bioer Technology, Binjiang, China), utilizando o ensaio tipo TaqMan<sup>®</sup> (RANADE *et al*, 2001) (GoTaq Genotyping, Applied Biosystem, Foster City, CA., EUA) com 1.5uL de DNA a 4ng/uL em um volume final de 5uL. O programa para termociclagem ocorreu a 95°C por dez minutos, seguidos de 40 ciclos a 92°C por 15 segundos e 60°C por um minuto.

Considerando que as regiões estudadas se localizam no mesmo cromossomo, em um mesmo gene, acredita-se que elas possam atuar como uma unidade. Portanto, polimorfismos nestes genes não foram analisados somente individualmente, mas também em combinação denominados como haplótipos.

#### 4.3 Análise Estatística

As variáveis nominais foram expressas como frequências e porcentagens. Para calcular a significância das variáveis nominais entre os grupos, foi realizado o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ). A variável numérica (idade) foi expressa em média e desvio padrão. O teste de Shapiro-Wilk avaliou a distribuição da normalidade, e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste *t* foi utilizada para comparação das médias entre os grupos.

As diferenças na prevalência dos genótipos e alelos entre os grupos foram

analisadas pelo teste do qui-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) feito após constatado o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos e o risco associado das frequências alélicas e genótipos com o desenvolvimento da TTP foi calculado pelo *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95% (IC).

A análise estatística foi aplicada com o programa Stata 11.1<sup>®</sup> (Stata Corp, College Station, TX). Para o cálculo dos haplótipos, o programa de computador ARLEQUIN foi utilizado (v.20 <http://anthro.unige.ch/arlequin>).

## 5. Resultados

---

No total, 248 participantes mulheres foram incluídas no estudo, com idade média de  $60.0 \pm 10.44$  anos. Não houve diferença significativa ( $p=0.14$ ) em relação a idade entre os grupos (Tabela 1). A média de idade para o grupo controle ( $n=169$ ) e para o grupo TTP ( $n=79$ ) foi de  $59.0 \pm 9.99$  e  $61.01 \pm 11.48$  anos, respectivamente.

Tabela 1: Características da população estudada

|                       | Total (n=248)    | Controle (n=169) | TTP (n=79)        | p-valor |
|-----------------------|------------------|------------------|-------------------|---------|
| %                     | 100              | 68,1             | 31,9              |         |
| Idade $\pm$ DP (anos) | $60.0 \pm 10.44$ | $59.0 \pm 9.99$  | $61.01 \pm 11.48$ | 0,14    |

Consideramos como base para o cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg os dados da Tabela 4. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg demonstra a homogeneidade da distribuição alélica populacional ao longo das gerações, sendo premissa para o cálculo das frequências genotípicas. A distribuição dos genótipos da sequência rs1799964 estava dentro do EHW (valor de  $p > 0.05$  na distribuição populacional), de acordo com o cálculo realizado, considerando o valor do  $\chi^2 < 3.84$  ([www.oege.org/software](http://www.oege.org/software)) (Tabela 2).

Tabela 2: Base para o cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

| Distribuição de Chi quadrado (um grau de liberdade) |      |      |       |       |
|-----------------------------------------------------|------|------|-------|-------|
| P valor                                             | 0,05 | 0,01 | 0,005 | 0,001 |
| $\chi^2$                                            | 3,84 | 6,63 | 7,88  | 10,83 |

Todas as análises dos genótipos e alelos consideraram a comparação entre os grupos controle e TTP. Do total de 248 genótipos, uma média de 4% dos genótipos não foi identificada, estando dentro do esperado para análise de polimorfismos, de acordo com o STREGA (STengthening the REporting of Genetic Association studies) (LITTLE *et al*, 2009).

O genótipo heterozigótico polimórfico para *TNFA* rs1800629 (AG) apresentou alta predominância no grupo TTP ( $p < 0.01$ ), assim como os genótipos incluindo o polimorfismo em G (AG+GG) ( $p < 0.01$ ) (Gráficos 1, 2 e 3 e Tabela 3).

Gráfico 1: Resumo dos achados para a Região rs1800629

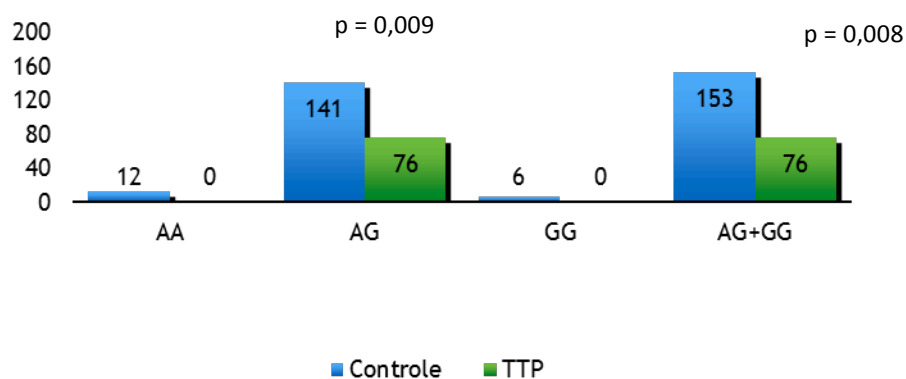


Gráfico 2: Resumo dos achados para a Região rs1799724

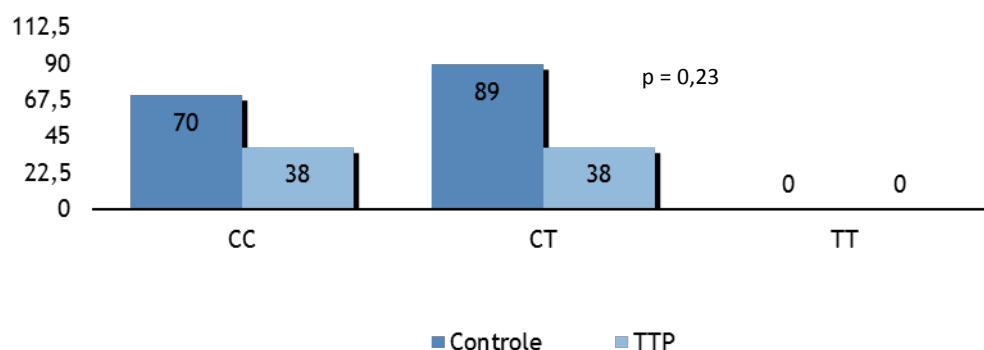
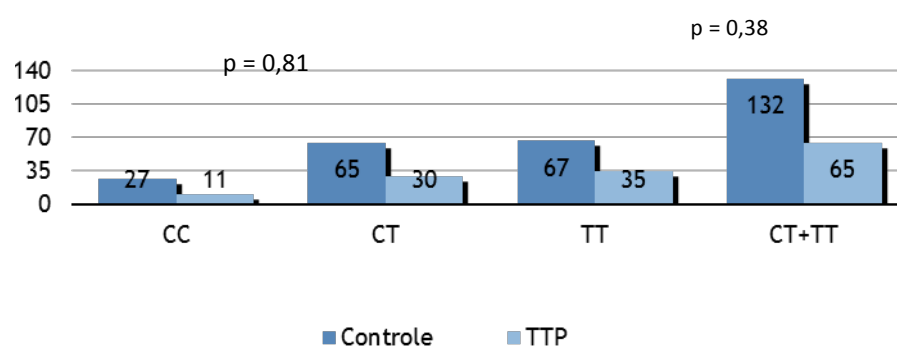


Gráfico 3: Resumo dos achados para a Região rs1799964



A distribuição dos haplótipos, em ambos os grupos (Tabela 4), organizados como alelos, considerou a sequência das bases de nucleotídeos no gene *TNFA* dentro do cromossomo 6, e detecção de menor frequência de 0,01. Na população estudada não houve relação significativa entre os haplótipos e a TTP.

Tabela 3: Resumo dos achados das regiões estudadas (por alelos)

|                                  | Controle | TTP     | p-valor | OR   | IC        |
|----------------------------------|----------|---------|---------|------|-----------|
|                                  | (n=169)  | (n=79)  |         |      |           |
|                                  | n (%)    | n (%)   |         |      |           |
| <b><i>TNFA</i><br/>rs1800629</b> |          |         |         |      |           |
| A                                | 165(52)  | 76(50)  | 0,38    | 0,92 | 0,62-1,35 |
| G                                | 153(48)  | 76(50)  |         |      |           |
| <b><i>TNFA</i><br/>rs1799724</b> |          |         |         |      |           |
| C                                | 229(72)  | 114(75) | 0,28    | 1,16 | 0,74-1,81 |
| T                                | 89(28)   | 38(25)  |         |      |           |
| <b><i>TNFA</i><br/>rs1799964</b> |          |         |         |      |           |
| C                                | 119(37)  | 52(34)  | 0,28    | 0,86 | 0,58-1,30 |
| T                                | 199(63)  | 100(66) |         |      |           |

Tabela 4: Distribuição dos haplótipos nos grupos controle e TTP.

| Gene                                               | Haplótipo | Frequência Estimada |            | p-valor | Odds Ratio | 95% IC     |
|----------------------------------------------------|-----------|---------------------|------------|---------|------------|------------|
|                                                    |           | Controle (n=169)    | TTP (n=79) |         |            |            |
| <i>TNFA</i><br>rs1800629<br>rs1799724<br>rs1799964 | GCT       | 0.28                | 0.33       | ---     | 1.00       | ---        |
|                                                    | ACT       | 0.18                | 0.16       | 0.11    | 4.66       | 0.70-30.90 |
|                                                    | GCC       | 0.18                | 0.16       | 0.43    | 2.32       | 0.28-18.93 |
|                                                    | ATT       | 0.14                | 0.15       | 0.15    | 4.67       | 0.58-37.29 |
|                                                    | ATC       | 0.11                | 0.09       | 0.11    | 3.45       | 0.77-15.50 |
|                                                    | ACC       | 0.06                | 0.08       | 0.39    | 2.04       | 0.40-10.45 |

Das oito possibilidades de combinação duas foram identificadas, mas com frequência <0,02 considerada estatisticamente insignificante.

## 6. Discussão

---

As tendinopatias constituem um importante grupo de problemas na prática ortopédica em especial no âmbito da medicina desportiva e da medicina ocupacional (PETERS *et al*, 2015). Estão associadas a altos custos para a administração de saúde pública e suplementar, além de diminuir substancialmente a qualidade do trabalho e do desempenho de funções. Quando o tratamento acarreta em regeneração ineficaz ou incompleta, as lesões podem levar a disfunções e incapacidade física definitivas (SHARMA e MAFFULLI, 2006; HOPE *et al*, 2007; WU *et al*, 2011).

A Tendinopata do Tibial Posterior é uma doença cujo caráter genético foi pouco explorado. Apenas alguns estudos relacionaram polimorfismos ao desenvolvimento desta tendinopatia (GODOY-SANTOS *et al*, 2013; GODOY-SANTOS *et al*, 2014; BARONEZA *et al*, 2014).

O presente estudo teve como objetivo principal relacionar polimorfismos com a Tendinopatia do Tibial Posterior (TTP) sendo o primeiro a evidenciar, de forma clara e objetiva, a correlação entre o gene *TNFA* e a presença desta doença. Nosso principal achado foi que indivíduos heterozigotos para *TNFA* rs1800629 tem maior propensão a desenvolver TTP.

Podemos explorar alguns aspectos de extrema relevância clínica e laboratorial. Quando mantido, o caráter polimórfico do rs1800629 influencia na TTP, demonstrando a base genética da doença e uma possível futura ferramenta para o desenvolvimento de fármacos, ou abordagens preventivas.

Concordamos com o modelo proposto por Wu *et al* (2011), no qual a Morte Celular Programada (MCP) exerce papel fundamental na fisiopatologia das tendinopatias. O TNF- $\alpha$  é uma citocina envolvida na sinalização da MCP tipo necroptose através do receptor TNF-R1 (FUCHS *et al*, 2015) e aumento significativo de MCP foi demonstrada em tendinopatias do patelar (LIAN, 2007) e calcâneo (GAIDA *et al*, 2012), mas não foi replicada *in vitro* (SCHULZE-TANZIL *et al*, 2011).

O papel do TNF- $\alpha$  nas tendinopatias é pouco abordado. Estudos de Wu *et al* (2011) e Lian *et al* (2007) que analisaram tecidos oriundos de tendinopatias, observaram alta concentração de células apoptóticas relacionadas ao desenvolvimento da lesão. Gaida *et al* em 2012 sugeriu que o TNF- $\alpha$ , ao modular a apoptose e proliferação dos tenócitos, poderia ser a origem primária da degeneração tendínea. Bagge em 2013 sedimentou tais achados relacionando as vias do TNF- $\alpha$  e neurotrofinas na patogênese de tendinopatias do calcâneo (Figura 6). No entanto, SHULZE-TANZIL *et al* (2011) não observou efeito pró-apoptose em culturas *in vitro* de tenócitos humanos. Rickaby *et al* em 2015 demonstrou que polimorfismos de *TNFRSF1A*, *CASP3* e *CASP8* não estavam associados à tendinopatia do calcâneo em uma população inglesa caucasiana.

Por outro lado, terapias com inibidores do TNF- $\alpha$  promoveram regressão do quadro de tendinopatia do calcâneo em pacientes com espondilite anquilosante (AYDIN *et al*, 2010). Para entender melhor a fisiopatologia das tendinopatias é essencial aprofundar o conhecimento sobre a atuação do TNF- $\alpha$  nos tendões.

Tabela 7: Estudos correlacionando polimorfismos em um único gene e o risco de desenvolver TTP.

| AUTORES        | ANO  | AMOSTRA                      | POPULAÇÃO           | POLIMORFISMO            | RESULTADO                                                                                      |
|----------------|------|------------------------------|---------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Baroneza et al | 2014 | 50 mulheres<br>100 controles | Brasileira (Paraná) | MMP1 (-519,-1607, -519) | Significante relação entre o polimorfismo para MMP1 -519 e haplótipos para mmp1 e Risco de TTP |
| Godoy et al    | 2013 | 50 mulheres<br>100 controles | Brasileira (Paraná) | MMP1 (-1607)            | Significante relação entre o polimorfismo para MMP1 -1607 e TTP                                |
| Godoy et al    | 2014 | 50 mulheres<br>100 controles | Brasileira (Paraná) | MMP8 (-799)             | Significante relação entre indivíduos com apelo T e incidência de TTP                          |

Do ponto de vista genético, a TTP é uma doença considerada de origem multifatorial, sendo representada pela interação meio-ambiente X gene (MAGRA e MAFFULLI, 2013). A TTP primordialmente acomete mulheres a partir dos quarenta anos de idade (HADDAD *et al*, 2014). De forma a tentar minimizar a influência do meio-ambiente no desenvolvimento das tendinopatias, os grupos foram pareados em relação à idade e ao sexo, sendo incluídos apenas voluntários do sexo feminino, o que torna os grupos mais homogêneos e aumenta o impacto dos nossos achados.

Especificamente para a TTP, os trabalhos ainda são escassos, e apenas estudaram genes envolvidos com a etapa final do processo degenerativo, mais especificamente as metaloproteinases, por meio de técnicas com precisão

deficiente para identificação dos genótipos individuais (Tabela 7). Estes estudos, no entanto, mostraram associação entre TTP e polimorfismo das metaloproteases 1 e 8 (GODOY-SANTOS *et al*, 2013; GODOY-SANTOS *et al*, 2014; BARONEZA *et al*, 2014). Tais proteínas estão presentes na fase final do ciclo de degeneração da matriz extracelular do tendão, sendo caracterizadas por sua atividade collagenase. O TNF- $\alpha$ , por sua vez, está envolvido no ciclo de MCP, que seria o fenômeno primário que provocaria a degeneração da matriz extracelular (WU, 2011), orquestrando a liberação e expressão de uma série de citocinas pró-inflamatórias, incluindo as MMPs. Além disso, utilizamos o método de PCR em tempo real, que é mais preciso que o PCR tradicional.

As regiões analisadas neste estudo no gene *TNFA* foram selecionadas com base na distribuição étnica proporcional entre caucasianos e afro-descendentes, conforme exposto no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>). Tal seleção dos polimorfismos a serem avaliados consideraram a miscigenação pertinente à população brasileira.

As regiões intrônicas, como as analisadas em nosso estudo, podem dar origem a pequenos RNAs não codificantes regulatórios, os MicroRNAs (miRNAs), os quais possuem importante função em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos (GALLO *et al*, 2012). Nosso estudo demonstrou que o polimorfismo da região intrônica rs1800629 estava relacionado à TTP, o que corrobora com tais achados. Os haplótipos não tiveram relação com a TTP. Tal fato pode ser explicado pelo caráter multifatorial da doença. Provavelmente, um grupo de

polimorfismos em genes diferentes - não apenas o TNFA, mas outros envolvidos na super-família do TNF.

Como forma de aprofundar o conhecimento da susceptibilidade genética à TTP, futuros estudos são necessários para explorar as características dos tendões degenerados. A expressão do RNA mensageiro e de microRNAs associados às regiões analisadas nesta pesquisa e, ainda, a análise de proteínas associadas a via do TNF- $\alpha$  são novas perguntas levantadas por nosso estudo.

## 7. Conclusões

---

1. Polimorfismo no gene *TNFA* rs1800629 está associado à tendinopatia do tibial posterior;
  2. Não foi encontrada correlação entre a tendinopatia do tibial posterior e haplótipos das regiões estudadas.
-

## 8. Bibliografia

---

- Aydin SZ, Karadag O, Filippucci E, Atagunduz P, Akdogan A, Kalyoncu U, et al. Monitoring Achilles enthesitis in ankylosing spondylitis during TNF- $\alpha$  antagonist therapy: an ultrasound study. *Rheumatology*, 49(3):578-582, 2010.
- Backman LJ, Eriksson DE, Danielson P. Substance P reduces TNF-alpha-induced apoptosis in human tenocytes through NK-1 receptor stimulation. *British Journal of Sports Medicine*, 48 (19), 1414-1420, 2014.
- Bagge J. TNF- $\alpha$  and Neurotrophins in Achilles Tendinosis. 1st ed. Umeå: Umeå University; 2013 January, 2013.
- Baroneza JE, Godoy-Santos A, Ferreira Massa B, Bocon de Araujo Munhoz F, Diniz Fernandes T, Leme Godoy dos Santos MC. MMP-1 promoter genotype and haplotype association with posterior tibial tendinopathy. *Gene*, 547(2):334-337, 2014.
- Bluman EM, Title CI, Myerson MS. Posterior tibial tendon rupture: a refined classification system. *Foot and Ankle Clinics*, 12(2):233-49, 2007.
- Collins M. Genetic risk factors for soft-tissue injuries 101: a practical summary to help clinicians understand the role of genetics and 'personalised medicine'. *British Journal of Sports Medicine*, 44: 915 - 917, 2010.
- Collins M, Raleigh SM. Genetic risk factors for musculoskeletal soft tissue injuries. *Medical Sports Science*, 54, 49, 2009.

- Cook JL, Feller JA, Bonar SF, Khan KM. Abnormal tenocyte morphology is more prevalent than collagen disruption in asymptomatic athletes' patellar tendons. *Journal of Orthopedic Research*, 22(2), 334-338, 2004.
- Corps AN, Robinson AHN, Harrall RL, Avery NC, Curry VA, Hazleman BL, Riley, GP. Changes in matrix protein biochemistry and the expression of mRNA encoding matrix proteins and metalloproteinases in posterior tibialis tendinopathy. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 71(5):746-52, 2012.
- Crovace A, Lacitignola L, Rossi G, Francioso E. Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. *Veterinary Medicine International*. ePub: 250978, 2010;.
- Fessel G, Snedeker JG. Evidence against proteoglycan mediated collagen fibril load transmission and dynamic viscoelasticity in tendon. *Matrix Biology*, 28(8), 503-510, 2009.
- Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 16(6), 329-344, 2015.
- Funk DA, Cass JR, Johnson KA. Acquired adult flat foot secondary to posterior tibial-tendon pathology. *Journal of Bone and Joint Surgery American*, 68(1), 95-102, 1986.
- Gaida JE, Bagge J, Purdam C, Cook J, Alfredson H, Forsgren S. Evidence of the TNF- $\alpha$  System in the Human Achilles Tendon: Expression of TNF- $\alpha$  and TNF Receptor at both Protein and mRNA Levels in the Tenocytes. *Cells Tissues Organs*, 196(4), 339-352, 2012.

- Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One*, 7(3), e30679, 2012
- Godoy-Santos A, Cunha MV, Ortiz RT, Fernandes TD, Mattar R, Jr., dos Santos MC. MMP-1 promoter polymorphism is associated with primary tendinopathy of the posterior tibial tendon. *Journal of Orthopedic Research*, 31(7):1103-1107, 2013.
- Godoy-Santos A, Ortiz RT, Mattar Junior R, Fernandes TD, Santos MC. MMP-8 polymorphism is genetic marker to tendinopathy primary posterior tibial tendon. *Scandinavian Journal of Medical Science in Sports*, 24(1), 220-223, 2014
- Golanó P, Vega J, de Leeuw PA, Malagelada F, Manzanares MC, Gotzens V, et al. Anatomy of the ankle ligaments: a pictorial essay. *Knee Surgery and Sports Traumatology and Arthroscopy*, 18(5), 557-569, 2010.
- Gonçalves-Neto J, Witzel SS, Teodoro WR, Carvalho-Junior AE, Fernandes TD, Yoshinari HH. Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. *Joint Bone Spine*, 69(2), 189-194, 2002
- HADDAD S., DELAND, J. T. Adult's Flat Foot. In: COUGHLING M. J., SALTZMAN, C. Mann's Surgery of the Foot and Ankle. 9<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2014. p. 1292-360.
- Holmes GB, Jr., Mann RA. Possible epidemiological factors associated with rupture of the posterior tibial tendon. *Foot and Ankle International*, 13(2), 70-79, 1992
- Hope M, Saxby TS. Tendon healing. *Foot and Ankle Clinics*. 2007;12(4):553-67.

- Jafari L, Vachon P, Beaudry F, Langelier E. Histopathological, biomechanical, and behavioral pain findings of Achilles tendinopathy using an animal model of overuse injury. *Physiological Reports*. 2015;3(1):e12265.
- Johnson KA, Strom DE. Tibialis posterior tendon dysfunction. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 239, 196-206, 1989.
- Jones GC, Corps AN, Pennington CJ, Clark IM, Edwards DR, Bradley MM, Hazleman, BL, Riley, GP. Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human achilles tendon. *Arthritis Rheumatology*, 54(3), 832-842, 2006.
- Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scandinavian Journal of Medical Science in Sports*, 10(6), 312-320, 2000.
- Kovacevic D, Rodeo SA. Biological augmentation of rotator cuff tendon repair. *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 466(3), 622-633, 2008.
- Kuchler EC, Tannure PN, Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Granjeiro JM, Amorim LM. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *Journal of Applied Oral Science*, 20(4), 467-471, 2012.
- Lian O, Scott A, Engebretsen L, Bahr R, Duronio V, Khan K. Excessive apoptosis in patellar tendinopathy in athletes. *American Journal of Sports Medicine*, 2007, 35(4), 605-611.
- Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, et al. Strengthening the REporting of Genetic Association studies (STREGA)--an extension of the STROBE statement. *European Journal of Clinical Investigation*, 39(4), 247-266, 2009.

Magra M, Maffulli N. Genetics: does it play a role in tendinopathy? *Clinical Journal of Sports Medicine*, 17(4), 231-233, 2007.

Mokone GG, Gajjar M, September AV, Schwellnus MP, Greenberg J, Noakes TD, Collins, M. The guanine-thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C gene is associated with achilles tendon injuries. *American Journal of Sports Medicine*, 33(7), 1016-1021, 2005.

Motta GR, Amaral MV, Rezende E, Pitta R, dos Santos Vieira TC, Duarte MEL, Vieira, AR, Casado, P. Evidence of genetic variations associated with rotator cuff disease. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 23, 227-235, 2014.

Myerson MS. Adult Acquired Flatfoot Deformity. Treatment of Dysfunction of the Posterior Tibial Tendon. *Instructional Course Lectures of The American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 78, 780-792, 1996.

Nakama LH, King KB, Abrahamsson S, Rempel DM. Evidence of tendon microtears due to cyclical loading in an in vivo tendinopathy model. *Journal of Orthopaedic Research*, 23(5), 1199-1205, 2005.

Nell EM, van der Merwe L, Cook J, Handley CJ, Collins M, September AV. The apoptosis pathway and the genetic predisposition to Achilles tendinopathy. *Journal of Orthopaedic Research*, 30(11), 1719-1724, 2012.

NUSSBAUM R, McINNES, RR, WILLARD, HF. Variação Genética em Indivíduos e Populações: Mutação e Polimorfismo. In: THOMPSON & THOMPSON Genética Médica. 7a ed: Elsevier; 2008. p. 181-214.

- Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor alpha signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 20(2), 87-103, 2010.
- Peters JA, Zwerver J, Diercks RL, Elferink-Gemser MT, van den Akker-Scheek I. Preventive interventions for tendinopathy: A systematic review. *Journal of Science in Medicine and Sport*, publicado online, 2015.
- Posthumus M, Collins M, Cook J, Handley CJ, Ribbans WJ, Smith RK, Schwellnus, MP, Raleigh, SM. Components of the transforming growth factor-beta family and the pathogenesis of human Achilles tendon pathology--a genetic association study. *Rheumatology*, 49(11), 2090-2097, 2010.
- Posthumus M, September AV, O'Cuinneagain D, van der Merwe W, Schwellnus MP. The COL5A1 gene is associated with increased risk of anterior cruciate ligament ruptures in female participants. *American Journal of Sports Medicine*, 37, 2234 - 2240, 2009.
- Prado MP, de Carvalho AE, Jr., Rodrigues CJ, Fernandes TD, Mendes AA, Salomão O. Vascular density of the posterior tibial tendon: a cadaver study. *Foot and Ankle International*, 27(8), 628-631, 2006.
- Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, Pesich, R, Herbert, J, Chen, YDI, Dzau, V, Curb, D, Olshen, R, Risch, N, Cox, DR, Botstein, D. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Research*, 11(7), 1262-1268, 2001.
- Ribbans WJ, Collins M. Pathology of the tendo Achillis: do our genes contribute? *Bone Joint Journal*, 95-b(3), 305-313, 2013.
- Rickaby R, El Khoury L, Ribbans WJ, Raleigh SM. Variation within three apoptosis associated genes as potential risk factors for Achilles tendinopathy in a British based case-control cohort. *Gene*, 571(2), 167-171, 2015.

- Riley G. Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatology*, 4(2), 82-89, 2008.
- Sakabe T, Sakai T. Musculoskeletal diseases--tendon. *British Medical Bulletin*, 99, 211-225, 2011.
- Salles JI, Amaral MV, Aguiar DP, Lira DA, Quinelato V, Bonato LL, Duarte, MEL, Vieira, AR, Casao, PL. BMP4 and FGF3 haplotypes increase the risk of tendinopathy in volleyball athletes. *Journal of Science in Medicine and Sport*, 18(2), 150-155, 2015.
- Satomi E, Teodoro WR, Parra ER, Fernandes TD, Velosa AP, Capelozzi VL, Yoshinari, NH. Changes in histoanatomical distribution of types I, III and V collagen promote adaptative remodeling in posterior tibial tendon rupture. *Clinics*, 63(1), 9-14, 2008.
- Schulze-Tanzil G, Al-Sadi O, Wiegand E, Ertel W, Busch C, Kohl B, Pufe, T. The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 21(3), 337-351, 2011.
- September AV, Posthumus M, Collins M. Application of genomics in the prevention, treatment and management of Achilles tendinopathy and anterior cruciate ligament ruptures. *Recent Patents in DNA & Gene Sequences*, 6, 216-223, 2012.
- September AV, Schwellnus MP, Collins M. Tendon and ligament injuries: the genetic component. *British Journal of Sports Medicine*, 41, 241 - 246, 2007.

- Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 6(2), 181-190, 2006.
- Sherratt M. Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age*, 31, 305 - 325, 2009.
- Taylor SE, Vaughan-Thomas A, Clements DN, Pinchbeck G, Macrory LC, Smith RK, Clegg, PD. Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 10, 27, 2009.
- Tucker R, Collins M. What makes champions? A review of the relative contribution of genes and training to sporting success. *British Journal of Sports Medicine*, 46(8), 555-561, 2012.
- Wang JH. Mechanobiology of tendon. *Journal of Biomechanics*, 39(9), 1563-1582, 2006
- Watanabe K, Kitaoka HB, Fujii T, Crevoisier X, Berglund LJ, Zhao KD, Kaufman, KR, An, KN. Posterior tibial tendon dysfunction and flatfoot: analysis with simulated walking. *Gait and Posture*, 37(2), 264-268, 2013
- Wu B, Chen J, Dela Rosa T, Yu Q, Wang A, Xu J, Zheng, MH. Cellular response and extracellular matrix breakdown in rotator cuff tendon rupture. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 131(3), 405-411, 2011.
- Xu Y, Murrell GA. The basic science of tendinopathy. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 466(7), 1528-1538, 2008.
- Yuan J, Murrell GA, Wei AQ, Wang MX. Apoptosis in rotator cuff tendonopathy. *Journal of Orthopaedic Research*, 20(6), 1372-1379, 2002

Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases.  
*Journal of Clinical Periodontology*, 35, 286-291, 2008.

Anexo I: Parecer Consubstanciado do CEP

INSTITUTO NACIONAL DE  
TRAUMATO - ORTOPEDIA /  
INTO / SAS/ MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DE MARCADORES GENÉTICOS NA TENDINOPATIA DO TIBIAL

**Pesquisador:** Vitor Miranda

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 25354613.7.0000.5273

**Instituição Proponente:** Instituto Nacional de Traumatismo - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

**Patrocinador Principal:** Instituto Nacional de Traumatismo - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 548.539

**Data da Relatoria:** 26/02/2014

**Apresentação do Projeto:**

De acordo com o proposto pela instituição onde a pesquisa será realizada.

**Objetivo da Pesquisa:**

De acordo com o projeto proposto.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Descritos no corpo do projeto

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Muito interessante e de grande interesse para o entendimento da patologia em questão

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

OK

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Ainda falta verificar o aceite da instituição em patrocinar o valor da pesquisa.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@info.saude.gov.br

INSTITUTO NACIONAL DE  
TRAUMATO - ORTOPEDIA /  
INTO / SAS/ MS



Continuação do Parecer: 548.539

**Necessita Avaliação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

RIO DE JANEIRO, 07 de Março de 2014

Assinador por:  
Marisa Peter Silva  
(Coordenador)

**Endereço:** Avenida Brasil, nº 500

**Bairro:** São Cristóvão

**CEP:** 20.940-070

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)2134-5000

**Fax:** (21)2134-5228

**E-mail:** cep.int@into.saude.gov.br

## Anexo II: Modelo do TCLE utilizado



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 12/12/2012)

Participante: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Prontuário : \_\_\_\_\_ Telefone: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: "Fatores Genéticos na Tendinopatia do Tibial Posterior", pesquisador responsável: Vitor Almeida Ribeiro de Miranda. A sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você poder desistir de participar e retirar seu consentimento. A sua identidade será mantida em sigilo. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em relação com o seu médico ou com o seu tratamento no INTO. Não haverá mudanças no seu tratamento como adiantamento na fila de cirurgia ou tipo de cirurgia que será realizado.

O motivo que nos leva a estudar a Tendinopatia do Tibial Posterior é a necessidade de entendermos melhor a origem desta doença. A pesquisa se justifica, pois a comunidade científica – pesquisadores - tem poucas informações sobre a influência de alterações genéticas relacionadas à origem da doença. O objetivo desse projeto é Identificar alterações genéticas em portadores da Tendinopatia do Tibial Posterior (inflamação do tendão do pé) em comparação com pessoas sem a doença. Para participar da pesquisa, você responderá a um questionário na presença de um dos pesquisadores, logo depois fará um bochecho com 5ml de soro fisiológico por um minuto para coleta de células para obtenção de material genético (DNA). O soro será coletado em um recipiente e encaminhado para processamento no laboratório do INTO. Além disso, em caso de necessidade de procedimento cirúrgico para tratamento da lesão no tendão Tibial Posterior (tendão do pé), permitir que o material que seria descartado durante a cirurgia (raspado do tendão) seja coletado e armazenado para análise laboratorial (medição da quantidade de proteínas alteradas no tendão).

Sua participação na pesquisa não acarretará riscos.

Os benefícios relacionados com a sua participação são principalmente um melhor entendimento da origem e desenvolvimento da lesão e auxílio num possível protocolo de tratamento a ser estabelecido no futuro.

Os resultados dos exames laboratoriais não serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar.

Os custos principais de manejo das amostras coletadas, custeio etc. serão cobertos pelo INTO. A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional, pois a pesquisa será realizada no dia de sua consulta ambulatorial de rotina.

Eu declaro que fui informada(o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. O(a) pesquisador(a) ou colaborador (a) certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Em caso de dúvidas poderei entrar em contato com o pesquisador Vitor Almeida Ribeiro de Miranda ou com o INTO nos telefones (21) 2134-5015 e 2134-5034.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

|                            |      |
|----------------------------|------|
| Assinatura do Participante | Data |
|----------------------------|------|

|                                     |      |
|-------------------------------------|------|
| Assinatura e carimbo do Pesquisador | Data |
|-------------------------------------|------|

|      |                          |      |
|------|--------------------------|------|
| Nome | Assinatura da Testemunha | Data |
|------|--------------------------|------|

Anexo III: Ficha Clínica de cadastro dos participantes

**GRUPO TENDINOPATIA DO TIBIAL POSTERIOR**

| TESTE              |       | CONTROLE   |
|--------------------|-------|------------|
| <b>Nome:</b>       |       |            |
| <b>Prontuário</b>  |       | <b>DNA</b> |
| Nascimento:        | Sexo: | Tel:       |
| Ativ. Física:      |       |            |
| <b>Pesquisador</b> |       |            |

| Procedimentos                               |                |        |         |             |     |      |       |   |   |
|---------------------------------------------|----------------|--------|---------|-------------|-----|------|-------|---|---|
| Artrodese:                                  | Subt           | TN     | CC      | Tríplice    | TT  | Pan. | Data: | / | / |
| Tipo de fixação: TN>                        |                | Subt>  |         |             | CC> |      |       |   |   |
| TT>                                         |                |        | Osteot> |             |     |      |       |   |   |
| Osteotomia(s):                              | Koutisugianis. | Dweyer | Cotton  | SCARF calc. |     |      |       |   |   |
| Transferência tendinosa:                    |                | FLD    | FLH     | FL          |     |      |       |   |   |
| Outros:                                     |                |        |         |             |     |      |       |   |   |
|                                             |                |        |         |             |     |      |       |   |   |
|                                             |                |        |         |             |     |      |       |   |   |
| DATA DA COLETA DA SALIVA:     /     /     . |                |        |         |             |     |      |       |   |   |
|                                             |                |        |         |             |     |      |       |   |   |
|                                             |                |        |         |             |     |      |       |   |   |
| <b>Achados Cirúrgicos</b>                   |                |        |         |             |     |      |       |   |   |
|                                             |                |        |         |             |     |      |       |   |   |
|                                             |                |        |         |             |     |      |       |   |   |