



**MINISTÉRIO DA SAÚDE**  
**SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE**  
**INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA**  
**CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS AO SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO**

**DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICOS EM**  
**PACIENTES COM LESÃO DO MANGUITO ROTADOR**

**MARCUS VINICUS GALVÃO AMARAL**

**RIO DE JANEIRO - RJ**

**2016**

**MINISTÉRIO DA SAÚDE**  
**SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE**  
**INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA**  
**CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS AO SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO**

**MARCUS VINICIUS GALVÃO AMARAL**

**DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICOS EM**  
**PACIENTES COM LESÃO DO MANGUITO ROTADOR**

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: Profa. Dra. Verônica Vianna

**Rio de Janeiro - RJ**

**2016**

**MARCUS VINICUS GALVÃO AMARAL**

**DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICOS EM  
PACIENTES COM LESÃO DO MANGUITO ROTADOR**

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.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Benno Ejnisman ( UNIFESP )**

**Prof. Dra. Fernanda Moll ( UFRJ / ID'OR )**

**Prof. Dra. Amanda Cavalcanti (INTO)**

**Revisora: Prof. Dra. Jamila Perini (INTO)**

**Suplente: Prof. Dra. Maria Eugênia Leite Duarte (INTO)**

**RIO DE JANEIRO– RJ**

**2016**

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

A479d    Amaral, Marcus Vinicius Galvão.  
          Diminuição da expressão de fatores de crescimento fibroblásticos em  
          pacientes com lesão do manguito rotador. / Marcus Vinicius Galvão Amaral.  
          — 2016.  
          93f.

          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. Manguito rotador. 2. Ombro. 3. Tendinopatia. 4. Expressão gênica.  
          5. Fator de crescimento fibroblástico. 6. Tendão. 7. Ortopedia. I. Vianna,  
          Verônica Fernandes, orient. II. Título.

NLM WE XXX

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha esposa, Roberta, que me faz diariamente melhorar como ser humano, ampliando meus horizontes, permitindo que eu alcance o impossível. Por ter escolhido me amar, e permitir que eu a ame, todos os dias, me apoiando e auxiliando, me oferecendo uma vida maravilhosa ao seu lado, repleta de alegrias e conquistas. Essa vitória também é sua !

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me oferece.

Aos meus pais, Celso e Vera Lucia, pelo amor e exemplo de vida, pela herança moral e ética, por terem me oferecido a educação como maior herança. Pelo apoio incondicional as minhas decisões. Eu sei da dedicação e esforço de vocês!

A minha família, pelo suporte em todos os momentos. Ao meu irmão, Pedro, por ser meu espelho em todas as suas virtudes. A minha madrinha (“querida Dinda”), meus primos e avós. Ao meu querido sogro, pela capacidade de agregar, e criar harmonia.

Aos amigos pela alegria de nossa convivência, por perdoarem minha ausência em momentos importantes.

Ao meu mestre na ortopedia, Geraldo Motta, pelo exemplo, pela bondade em ensinar, humildade em dividir o conhecimento, e motivação em buscar o saber. Por ter me permitido ser seu aprendiz.

A minha orientadora Verônica Vianna, pelo auxílio em toda minha formação na ortopedia.

Ao também mestre e amigo, Martim Monteiro, pela oportunidade do convívio no âmbito profissional e pessoal. Por me permitir aprender com seus princípios e habilidades.

A toda equipe do Centro de Pesquisa Clínica do INTO pela motivação e incentivo para a execução desse projeto, especialmente a pesquisadora, Priscila Casado Ladeira, pela enorme contribuição científica.

A todos os médicos do CCOC do INTO, pela amizade, colaboração e por ampliarem o nível da cirurgia do ombro e cotovelo. Aos médicos do CCJ pela contribuição na execução do projeto.

Ao INTO, por ser minha escola na ortopedia e traumatologia, por ter permitido minha formação como médico ortopedista, cirurgião e professor.

## RESUMO

Amaral, Marcus Vinicius Galvão. **Diminuição da expressão de fatores de crescimento fibroblásticos em pacientes com lesão do manguito rotador**. 2015. 91fls. Dissertação (Mestrado em Ciências aplicadas ao sistema musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, 2015.

A doença do manguito rotador é a mais comum no ombro. Causa disfunção articular, acometendo indivíduos de diversas idades e graus de atividade. Sua etiologia é multifatorial, e há evidência de um componente genético que influencia na regulação da homeostasia do tendão. O fator de crescimento fibroblástico (FGF) desenvolve importante função na modulação do processo de reparo tecidual em tendões. Esse estudo investigou a expressão dos membros da família FGF em tendões lesionados do manguito rotador e comparou com tendões normais. O grupo de estudo (N=31) foi formado por amostras do coto do tendão supraespalhal de pacientes submetidos a reconstrução cirúrgica do manguito rotador (LMR), e o grupo controle (N=10) foi constituído de amostras de coto do tendão semitendinoso de pacientes submetidos a reconstrução do ligamento cruzado anterior com autoenxerto de tendões flexores do joelho e que não apresentavam doença no manguito rotador. As amostras de coto dos tendões coletados foram imediatamente cultivadas para a proliferação dos tenócitos para extração do RNA mensageiro (RNAm), que, em seguida, foi convertido em DNA complementar pelo ensaio de transcriptase reversa para posterior caracterização dos tenócitos e análise da expressão dos genes *FGF2*, *FGF3*, *FGF10*, *FGFR1* e *FGFR2* pela técnica de PCR em tempo real utilizando o sistema SYBR Green. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa STATA 1.1. A expressão gênica de tendomodulina, colágeno tipo I, esclerase e fibromodulina confirmou o fenótipo para os tenócitos da amostra. Os genes *FGF2* ( $p=0,001$ ), *FGF3* ( $p=0,002$ ), *FGF10* ( $p=0,001$ ) e *FGFR1* ( $p=0,0007$ ) apresentaram menor expressão no grupo de pacientes com LMR em comparação ao controle. Em conclusão, podemos afirmar que o grupo com LMR apresentou diminuição na expressão de *FGF2*, *FGF3*, *FGF10* e *FGFR1*, o que não ocorreu com o *FGFR2*, quando comparados com tendões semitendinosos saudáveis em pacientes que não apresentavam lesões do manguito rotador. Assim, sugerimos uma forte associação da via do FGF e os mecanismo de degeneração e reparo do manguito rotador. Esse resultado servirá de fundamento para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de doenças do manguito rotador.

Palavras-chave: manguito rotador, tendinopatia, expressão gênica, fator de crescimento fibroblástico

## ABSTRACT

Amaral, Marcus Vinicius Galvão. **Decreased expression of fibroblastic growth factors in patients with rotator cuff tears.** 2015. 91pp. Dissertação (Mestrado em Ciências aplicadas ao sistema musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, 2015.

The rotator cuff disease is the most common disorder of the shoulder. It causes joint dysfunctions, affecting individuals in different ages and activities. Its etiology is multifactorial, and there is an individual genetic predisposition, which influences the homeostasis of tendon tissue. The fibroblastic growth factor (FGF) development has an important role in modulating the tissue repair process in tendons. This study investigated the FGF family members expression in torn rotator cuff tendons and compared to healthy tendons. The study group (n=31) was composed by samples of surgery discharge debridements of supraspinatus tendon obtained in patients submitted to surgical rotator cuff repair (RCT), and the control group (N=10) was composed by samples of surgery debridements of semitendinoseus tendon from patients submitted to surgical reconstruction of anterior cruciate ligament with flexor tendons autograft of the knee and without a rotator cuff disease. All tendon samples collected were immediately grown to tenocytes proliferation to extract the mRNA, which, then, was converted in complementary DNA by a reverse transcriptase test for further tenocytes characterization and analysis of *FGF2*, *FGF3*, *FGF10*, *FGFR1* and *FGFR2* genes expression by real time PCR technique using SYBR Green system. All statistical analysis were done using STATA 1.1 software. Tendonin, collagen type I, scleraxis and fibromodulin gene expression confirmed the phenotype from tenocytes in the sample. *FGF2* (p=0,001), *FGF3* (p=0,002), *FGF10* (p=0,001) and *FGFR1* (p=0,007) genes presented lower expression in RCT group, when compared to semitendinoseus tendons from control group. In conclusion, we can affirm that a RCT group presented lower expression of *FGF2*, *FGF3*, *FGF10* and *FGFR1*, that didn't occurred with *FGFR2*, when compared with healthy semitendinoseus tendons in patients without rotator cuff disease, suggesting a strong association between FGF pathway and the mechanism of rotator cuff degeneration and repair. This result will be a basement for development of new strategies in the treatment of rotator cuff tendon disease.

Key-words: rotator cuff, tendinopathy, genic expression, fibroblastic growth factor

## SUMÁRIO

|            |                                                              |           |
|------------|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO</b>                                            | <b>15</b> |
| <b>2</b>   | <b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>                                  | <b>18</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Tendão</b>                                                | <b>18</b> |
| 2.1.1      | Estrutura                                                    | 18        |
| 2.1.2      | Celularidade                                                 | 21        |
| 2.1.3      | Vascularização                                               | 22        |
| 2.1.4      | Inervação                                                    | 23        |
| 2.1.5      | Metabolismo                                                  | 23        |
| 2.1.6      | Biomecânica                                                  | 24        |
| 2.1.7      | Resposta fisiológica                                         | 25        |
| 2.1.8      | Patologia                                                    | 26        |
| 2.1.9      | Cicatrização                                                 | 28        |
| 2.1.10     | Remodelação                                                  | 30        |
| <b>2.2</b> | <b>Manguito Rotador</b>                                      | <b>31</b> |
| 2.2.1      | Anatomia, estrutura e função                                 | 31        |
| 2.2.2      | Lesão do manguito rotador                                    | 32        |
| <b>2.3</b> | <b>Via do Fator de Crescimento Fibroblástico</b>             | <b>33</b> |
| 2.3.1      | Função do Fator de Crescimento Fibroblástico                 | 35        |
| 2.3.2      | Vias de sinalização dos Fatores de Crescimento Fibroblástico | 36        |
| 2.3.3      | FGF em tendões e músculos                                    | 38        |
| <b>2.4</b> | <b>Genética na lesão do Manguito Rotador</b>                 | <b>40</b> |
| 2.4.1      | Aplicações clínicas dos estudos genéticos                    | 42        |
| <b>3</b>   | <b>OBJETIVOS</b>                                             | <b>45</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Objetivo geral</b>                                        | <b>45</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Objetivo específico</b>                                   | <b>45</b> |
| <b>4</b>   | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>                                    | <b>46</b> |
| <b>4.1</b> | <b>População elegível</b>                                    | <b>46</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Coleta dos tendões</b>                                    | <b>50</b> |

|            |                                                                         |           |
|------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.3</b> | <b>Processamento dos tendões</b>                                        | <b>51</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Extração do RNA e análise da expressão gênica</b>                    | <b>51</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Análise estatística</b>                                              | <b>51</b> |
| <b>5</b>   | <b>RESULTADOS</b>                                                       | <b>56</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Resultados clínicos</b>                                              | <b>56</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Caracterização dos tenócitos</b>                                     | <b>58</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Resultados da expressão dos fatores de crescimento fibroblástico</b> | <b>59</b> |
| <b>6</b>   | <b>DISCUSSÃO</b>                                                        | <b>63</b> |
| <b>7</b>   | <b>CONCLUSÃO</b>                                                        | <b>74</b> |
| <b>8</b>   | <b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>                                         | <b>75</b> |
| <b>9</b>   | <b>ANEXOS</b>                                                           | <b>89</b> |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |                                                                                            |    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1-   | Estrutura do tendão                                                                        | 20 |
| Figura 2-   | Árvore filogenética da família FGF humana                                                  | 34 |
| Quadro 1 -  | Funções dos fatores de crescimento fibroblásticos                                          | 38 |
| Quadro 2 -  | Efeitos fisiológicos dos fatores de crescimento fibroblásticos e sua aplicação terapêutica | 44 |
| Figura 3 -  | Imagem de ressonância magnética de lesão do manguito rotador                               | 48 |
| Gráfico 1 - | Resultado da caracterização dos tenócitos                                                  | 58 |
| Gráfico 2 - | Resultados da expressão de FGF2 e FGF3                                                     | 60 |
| Gráfico 3 - | Resultados da expressão de FGF10 e FGFR1                                                   | 61 |
| Gráfico 4 - | Resultados da expressão de FGFR2                                                           | 62 |

## LISTA DE TABELAS

|           |                                                                                                               |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: | Dados clínicos dos pacientes do grupo com lesão do manguito rotador                                           | 49 |
| Tabela 2: | Dados clínicos dos pacientes do grupo controle                                                                | 50 |
| Tabela 3: | Sequência dos inicializadores utilizados para a caracterização dos tenócitos pela análise de expressão gênica | 54 |
| Tabela 4: | Sequência dos inicializadores utilizados para a expressão gênica de FGFs                                      | 54 |
| Tabela 5: | Dados demográficos e clínicos dos 41 participantes do estudo.                                                 | 57 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|              |                                                                |
|--------------|----------------------------------------------------------------|
| A            | Aminoácido adenosina                                           |
| ADIPOQ       | Gene ADIPOQ                                                    |
| AKT          | Serina/treonina quinase                                        |
| BAD          | Gene BAD                                                       |
| $\beta$ -FGF | Fator de crescimento fibroblástico básico                      |
| BLAST        | Base de dados para pesquisa de sequências biológicas primárias |
| BMP          | Proteína morfogenética óssea                                   |
| C            | Aminoácido citosina                                            |
| CCJ          | Centro de Cirurgia do Joelho                                   |
| CCOMC        | Centro de Cirurgia do Ombro e Cotovelo                         |
| c-DNA        | ácido desoxirribonucléico complementar                         |
| CEBPA        | Gene CEBPA                                                     |
| CEP          | Comitê de ética e pesquisa                                     |
| COL1A1       | Gene do colágeno tipo I                                        |
| COL3A1       | Gene do colágeno tipo III                                      |
| COL5A1       | Gene do colágeno tipo V                                        |
| CTCel        | Centro de Terapia Celular                                      |
| CTGF         | Fator de crescimento de conexão tecidual                       |
| DAG          | Diacylglicerol                                                 |
| DM           | Diabetes Mellitus                                              |
| DNA          | ácido desoxirribonucléico                                      |
| FGF          | Fator de crescimento fibroblástico                             |
| FGFR         | Receptor do fator de crescimento fibroblástico                 |
| FMOD         | Fibromodulina                                                  |
| FOXO         | Gene FOXO                                                      |
| G            | Aminoácido guanina                                             |
| GAB1         | Gene GAB1                                                      |

|         |                                                        |
|---------|--------------------------------------------------------|
| GAGs    | Glicosaminoglicanos                                    |
| GAPDH   | Proteína Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase         |
| GRB2    | Receptor de fator de crescimento ligado a proteína 2   |
| GDF     | Fator de diferenciação do crescimento                  |
| GTPase  | Enzimas hidrolases ligadas a proteína G                |
| HAS     | Hipertensão arterial sistêmica                         |
| IGF-1   | Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1      |
| INTO    | Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia        |
| ISCOVES | Meio de cultura celular ISCOVES                        |
| JMT     | Junção miotendínea                                     |
| JOT     | Junção osteotendínea                                   |
| LMR     | Lesão do manguito rotador                              |
| MARCKS  | Gene MARCKS                                            |
| MAPK    | Proteína quinase ativada por mitógenos                 |
| MEC     | Matriz extracelular                                    |
| MMPs    | Matrizes metaloproteinases                             |
| MSTN    | Gene MSTN                                              |
| MTOR    | Proteína alvo da rapamicina em mamíferos               |
| MYF5    | Gene MYF5                                              |
| MYOD    | Gene MyoD                                              |
| MYOG    | Gene MYOG                                              |
| NFAT    | Fator de transcrição ativado por células T             |
| PCK     | Proteína quinase                                       |
| PCR     | Reação de cadeia de polimerase                         |
| PDGF    | Fator de crescimento derivado de plaquetas             |
| PI3     | Trifosfato inositol                                    |
| PLC     | Fosfolipase tipo C                                     |
| PPAR    | Receptor ativador da proliferador de peroxisoma        |
| q-PCR   | Reação de cadeia de polimerase quantitativo            |
| RAS     | Proteína RAS                                           |
| RNA     | Ácido ribonucleico                                     |
| RNA-m   | Ácido ribonucleico mensageiro                          |
| RT-PCR  | Transcriptase reversa - reação de cadeia de polimerase |

|                |                                                       |
|----------------|-------------------------------------------------------|
| SCX            | Proteína esclerase                                    |
| SOs            | Genes modificadores do nucleotídio guanina            |
| SYBR           | Molécula intercalante de fita dupla de ácido nucleico |
| T              | Aminoácido Timina                                     |
| TGF $\beta$    | Fator de transformação de crescimento tipo beta       |
| TIMP           | Proteína inibidora de metaloproteínases               |
| TNC            | Tenascina-C                                           |
| TNMD           | Tendomodulina                                         |
| WNT10B         | Gene WNT10B                                           |
| %              | Porcentagem                                           |
| °C             | Graus Celsius                                         |
| IC             | Intervalo de confiança                                |
| g              | Gramas                                                |
| X <sup>2</sup> | qui-quadrado                                          |
| $\mu$ l        | microlitros                                           |
| $\mu$ m        | micrometros                                           |
| ng             | nanogramas                                            |
| nm             | nanometros                                            |
| mg             | miligramas                                            |

## 1 INTRODUÇÃO

O manguito rotador é formado pelos tendões dos músculos supraespinal, infraespinal, subescapular e redondo menor (CLARK e HARRYMAN,1992; CURTIS et al.,2005). A doença do manguito rotador é a mais comum no ombro, causa disfunção articular em diferentes intensidades, acometendo indivíduos de diferentes idades e graus de atividade, podendo se apresentar clinicamente como: tendinite, tendinose, lesão parcial e completa dos tendões (YAMAGUCHI et al.,2001; ENSOR et al.,2013).

No entanto, o tratamento bem sucedido dessas lesões permanece um desafio, devido a história natural progressiva das rupturas tratadas por métodos incruentos e do alto índice de falhas após o reparo cirúrgico. Isso ocorre porque o desenvolvimento da doença do manguito rotador não é um fenômeno puramente mecânico, mas também envolve modificações biológicas associadas, relacionadas principalmente à degeneração tendinosa intrínseca (YAMAGUCHI et al.,2001; CHAUDHURY e CARR,2012).

Evidências sugerem que a composição celular, vascular e da matriz extracelular do coto do tendão roto, assim como seu metabolismo e viabilidade, estão alterados em pacientes com doença do manguito rotador. Por isso, tem sido proposto que as tendinopatias e rupturas tendinosas ocorrem quando os mecanismos de reparo tecidual estão desregulados (LONGO et al.,2008). Porém, a fisiopatologia das tendinopatias e rupturas do manguito rotador, assim como as razões para a falha de sua cicatrização, permanecem indefinidas, dificultando o tratamento (KER,2002). Além disso, apesar dos fatores de risco associados com a lesão, ainda não está claro a

razão da doença acometer um grupo específico de indivíduos (YAMAMOTO et al.,2010). Por isso, a literatura sugere que exista uma predisposição genética individual ao desenvolvimento da lesão (COLLINS e RALEIGH, 2009).

Uma pesquisa na população brasileira identificou a correlação entre polimorfismos genéticos associados aos genes *FGF3* e *FGFR1* com lesão do manguito rotador, despertando uma possível correlação entre a via do fator de crescimento fibroblástico (*FGF*) e o desenvolvimento da lesão (MOTTA et al.,2014). No entanto, ainda não está claro, se estas variáveis genéticas estão diretamente associadas com a presença de lesão no tendão.

Avaliar uma provável alteração da expressão gênica dos componentes da família do *FGF* nos tendões de pacientes com diagnóstico de doença do manguito rotador poderia oferecer uma nova fronteira na compreensão da patogênese e cicatrização desses tendões, além de servir de base para futuros métodos diagnósticos e terapêuticos em ortopedia.

Até o momento, alguns estudos correlacionam a presença de lesão do manguito rotador com a expressão de genes específicos, relacionados a miogênese (*MYOD1*, *MYF5*, *MYOG*, *MTOR*, *MSTN*), a adipogênese (*PPAR*, *CEBPA*, *ADIPOQ*, *WNT10B*) e fibrogênese (*TGFB*, *CTGF*, *COL1A1*, *COL3A1*, *TIMP1*, *TIMP3*, *MMP1*, *MMP3*, *MMP9*), que regulam a resposta degenerativa e regenerativa no sistema músculo-esquelético, e, nenhum estudou a via de *FGF* em tendões associados a esta lesão (FREY et al.,2009; SCHMULTZ et al.,2009; GAROFOLO R et al.,2011; DEL BUONO et al.,2012; CHOO et al., 2014; KILLIAN et al.,2013).

Acreditamos que estudar a via de *FGF* relacionada às lesões do manguito rotador poderá melhorar a compreensão do componente intrínseco relacionado a essa doença e consequentemente auxiliar na sua terapêutica.

## 2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1 Tendão

#### 2.1.1 Estrutura

Os tendões são estruturas do tecido conectivo, únicas, densas e definidas pela sua posição anatômica conectando o músculo ao osso. Os tendões consistem em uma tripla hélice reticulada, composta principalmente por colágeno e são capazes de transferir carga mecânica gerada pelo músculo ao osso, resultando em movimento e estabilização articular. A composição e estrutura da matriz dos tendões varia consideravelmente, de acordo com a função e a posição anatômica no corpo (BIRCH, 2007).

A massa total do tendão é constituída em 70% por água. A massa seca, em tendões normais, é formada por colágeno (65-80%), principalmente tipo I, e elastina (1-2%) (SHARMA e MAFFULLI, 2006). O restante da estrutura existente inclui colágeno tipo II nas zonas cartilaginosas, tipos III, IV e V na vasculatura, e tipo X na fibrocartilagem mineralizada próxima a êntese, dentre outros. O restante da estrutura dos tendões consiste em tenócitos e tenoblastos posicionados entre as fibras de colágeno e tecido de preenchimento composto por proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas estruturais e outras pequenas moléculas. Componentes inorgânicos representam menos de 0,2% da massa seca dos tendões, sendo o cálcio o principal componente, principalmente junto a área de inserção, e

diminuindo progressivamente sua concentração em direção a área tênsil (KANNUS,2000, WEINREB et al.,2014).

As fibrilas colágenas individuais são organizadas em fibras, e essas em subfascículos, e por fim, em fascículos, que são envoltos pela bainha do endotendão. Cada grupo de fascículos é organizado em um feixe de fibras agrupados em conjunto e envoltos pelo epitendão formando o tendão. (Figura 1) A orientação das fibras varia de acordo com a localização e função do tendão. As fibras colágenas são organizadas em paralelo no eixo do tendão, quando as forças são transmitidas pelo eixo longitudinal do tendão. Outros tendões podem ter uma distribuição trançada e emaranhada das fibras. A estrutura do tendão é extremamente complexa quando múltiplos músculos convergem a um tendão único (KANNUS,2000, WEINREB et al.,2014).

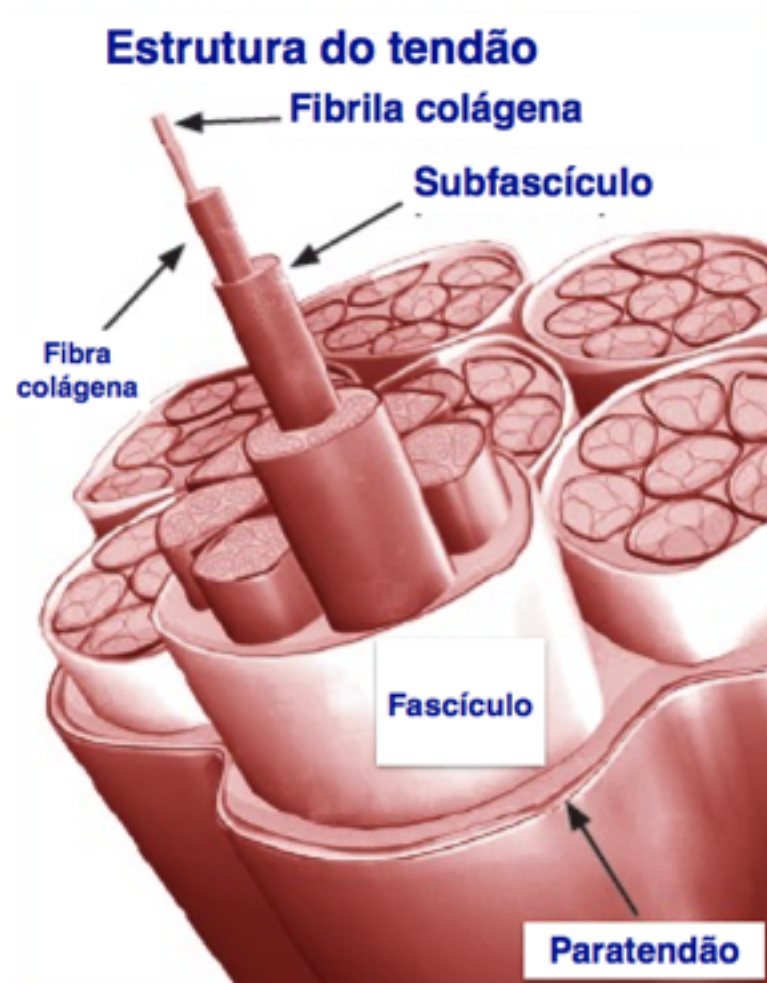


Figura 1- Estrutura do tendão: A proteína colágena se organiza em fibra colágena. A reunião de fibras colágenas origina o subfascículo que se torna um fascículo. Os fascículos são envoltos por endotendão e pelo peritendão, originando o tendão propriamente dito (Modificado de SHARMA e MAFFULLI, 2005).

### 2.1.2 Celularidade

A estrutura celular dos tendões é constituída por tenoblastos, tenócitos cercados por matriz extra-celular (MEC). Tenoblastos são células tendinosas imaturas, fusiformes, com numerosas organelas citoplasmáticas refletindo sua alta atividade metabólica. Com o envelhecimento, os tenoblastos tornam-se alongados e transformam-se em tenócitos. Os tenócitos possuem um citoplasma menor caracterizando uma baixa atividade metabólica. Juntos, os tenoblastos e tenócitos respondem por 90-95% da celularidade do tendão, sendo o restante constituído por elementos celulares, que são: condrócitos nos sítios de inserção, células sinoviais de bainha tendinosa e vasculares (SHARMA e MAFFULLI,2005; SHARMA e MAFFULLI,2006).

A base da substância da MEC é envolta por colágeno e tenócitos, e composta por glicoproteínas, glicosaminoglicanos (GAGs) e dentre outras moléculas. A forte natureza hidrofílica dos proteinoglicanos permite uma rápida difusão das moléculas solúveis de água, e migração celular. Glicoproteínas de adesão, como *fibronectina* e *trombospondina*, participam do mecanismo de reparo e regeneração do tendão. A *Tenascina-C*, outro importante componente da MEC, é abundante no corpo do tendão e nas junções osteotendinosa (JOT) e miotendínea (JMT). A expressão de *tenascina-C* é regulada por estresse mecânico, e está exacerbada nas tendinopatias e tem papel no alinhamento e orientações das fibras colágenas. (JOZSA et al.,1991; MEHR et al.,2000; SHARMA e MAFFULLI,2006).

Na JMT, as fibrilas colágenas tendinosas se inserem profundamente, permitindo que a tensão gerada pelas proteínas intracelulares contráteis das fibras musculares sejam transmitidas as fibrilas colágenas. Essa arquitetura complexa reduz o estresse tênsil exercido sobre os tendões durante a contração muscular. Apesar disso, a JMT é o ponto mais frágil da unidade músculo-tendinosa (SHARMA e MAFFULLI,2006).

A JOT é composta por quatro zonas: zona densa do tendão, fibrocartilagem, fibrocartilagem mineralizada e osso. A estrutura especializada da JOT previne deformação, desgaste, delaminação e falha das fibras colágenas (SHARMA e MAFFULLI, 2006).

### 2.1.3 Vascularização

Os tendões recebem seu suporte sanguíneo dos: sistemas intrínsecos, via JOT e JMT, e extrínsecos, via paratendão ou bainha sinovial. A razão entre o fluxo intrínseco e extrínseco varia dentre os diferentes tendões. A vascularização dos tendões é comprometida nas zonas juncionais e de tensão, atrito ou compressão. Geralmente, o fluxo sanguíneo tendinoso diminui com o envelhecimento e a sobrecarga mecânica (SHARMA e MAFFULLI,2006).

#### 2.1.4 Inervação

A inervação do tendão se origina dos troncos nervosos cutâneo, muscular e peritendinoso. A maioria das fibras nervosas não penetram no corpo do tendão, mas suas terminações se localizam na sua superfície.<sup>17</sup> As terminações nervosas das fibras mielinizadas funcionam como mecanorreceptores especializados que detectam mudanças de pressão e tensão (SHARMA e MAFFULLI, 2006). Esses mecanorreceptores, órgãos tendinosos de Golgi, são mais numerosos nas JMT (LEPHART et al.,1997). Já as terminações nervosas não mielinizadas atuam como nociceptores. Ambas as fibras, simpáticas e parassimpáticas, estão presentes nos tendões (ACKERMANN et al.,2001).

#### 2.1.5 Metabolismo

Os tenócitos sintetizam colágeno e todos os componentes da MEC, além de gerarem energia, através tanto do ciclo aeróbico de Krebs, como da glicólise anaeróbia e da via pentose-fosfato. Com o envelhecimento ou sob estresse mecânico, as vias metabólicas migram da produção de energia aeróbica para anaeróbica (KANNUS e JOZSA,1991; SHARMA e MAFFULLI, 2006).

O consumo de oxigênio pelos tendões e ligamentos é 7,5 vezes inferior ao do músculo esquelético. Em virtude da sua menor taxa metabólica

e sua bem desenvolvida capacidade de gerar energia anaeróbia, os tendões tem habilidade para conduzir sobrecarga e manter tensão por longos períodos, evitando o risco de isquemia e subsequente necrose. Porém, essa baixa atividade metabólica resulta em um lento processo cicatricial após lesão (SHARMA e MAFFULLI, 2006).

#### 2.1.6 Biomecânica

Tendões transmitem força gerada pelos músculos para os ossos, e atuam como um amortecedor, que absorve forças externas, limitando o dano muscular (SHARMA e MAFFULLI, 2006). Os tendões exibem uma grande força mecânica, boa flexibilidade, e uma excelente elasticidade, desempenhando um papel único (O'BRIEN, 1992).

O comportamento mecânico do colágeno é dependente do número e tipos de ligações intra e intermoleculares. Em repouso, as fibras e fibrilas colágenas apresentam uma configuração em frisos, e após exposição a tensão, se deformam. A partir de um determinado ponto de tensão, as fibras atingem um padrão linear devido ao deslizamento intramolecular das triplas hélices de colágeno, e as fibras se tornam paralelas. Permanecendo a tensão em limites fisiológicos, o tendão se comporta de forma elástica, retornando ao seu comprimento original após o relaxamento. Caso ocorra sobrecarga tênsil, ocorre falha da estrutura do tendão (FYFE e STANISH, 1992). Por meio de estudos de difração de raios X, foi demonstrado que no início da carga tênsil,

as fibrilas colágenas se alongam, porém, quando aumenta o estresse mecânico, o espaço intermolecular também aumenta, eventualmente levando a falha estrutural (FYFE e STANISH,1992; SASAKI et al.,1999; SHARMA e MAFFULLI,2006).

Atividades extremas expõem os tendões a sobrecargas. Quando essas forças ultrapassam a capacidade máxima do tendão, pode ocorrer ruptura. Tendões estão em alto risco de ruptura se as cargas forem aplicadas de forma rápida e em sentido oblíquo sobre as fibras, assim como durante a sobrecarga existente na contração muscular excêntrica (FYFE e STANISH, 1992; SHARMA e MAFFULLI,2006).

#### 2.1.7 Resposta fisiológica ao estresse

Em experimentos animais, o treinamento resulta em melhora da força tênsil, rigidez elástica, peso e espessura do tendão. Esses efeitos podem ser explicados pelo aumento na síntese de colágeno e MEC pelos tenócitos (KANNUS et al.,1997).

Imobilização prolongada após lesão musculo-esquelética geralmente provoca efeitos deletérios, através de diminuição do metabolismo e vascularização do tendão (MAGANARIS et al.,2006).

Além disso, as propriedades e funções dos tendões também se deterioram com o envelhecimento. A resistência e força diminuem, possivelmente devido a perda de colágeno e aumento da rigidez das fibras

(REEVES et al.,2003; SHARMA e MAFFULLI,2006). Treinamento de resistência em pacientes idosos pode reverter parcialmente o efeito do envelhecimento nos tendões (MAGANARIS et al.,2004).

#### 2.1.8 Patologia do tendão

Tendinopatia é uma lesão frequente causada por uso excessivo, prevalente em atletas e sedentários (LEWIS et al.,2009). É uma doença do tendão causada por fatores mecânicos, apesar de fatores intrínsecos ao tendão serem importantes na sua fisiopatologia (SEITZ et al.,2011). Dessa forma, há um entendimento de que trata-se de doença multifatorial (ARNOCZKY et al.,2007).

A etiologia intrínseca das tendinopatias permanece desconhecida, com diversas causas teorizadas, incluindo: hipóxia, isquemia, dano, estresse oxidativo, hipertermia, apoptose debilitada, mediação inflamatória, desequilíbrio da matriz das metaloproteases (SHARMA e MAFFULLI,2006).

A etiologia extrínseca baseia-se em achados de que estímulos mecânicos podem induzir diferentes respostas biológicas, seja estimulando o processo de reparo tecidual ou enfraquecendo o tendão e eventualmente rompendo-o (KER,2002). O mecanismo de reparo é mediado pelos tenócitos, que mantêm um equilíbrio entre a síntese e degradação da MEC (SHARMA e MAFFULLI,2006). Carga excessiva sobre os tendões durante atividade física vigorosa é considerada o principal estímulo patológico para a degeneração

tendinosa (SELVANETTI et al.,1997). Esse estímulo mecânico supra-fisiológico associado a presença de fatores de risco intrínsecos aumentam o risco de indução da tendinopatia, através de inflamação de sua bainha, degeneração do seu corpo ou a combinação de ambos. Da mesma forma, o dano ao tendão também pode ocorrer após estresses mecânicos repetidos dentro de limites fisiológicos, principalmente quando esse resulta de estresses desiguais sobre os tendões, produzindo concentrações de carga e forças de fricção anormais nas fibrilas tendinosas, impedindo o reparo tecidual e causando lesão. (SHARMA e MAFFULLI,2006).

Histologicamente, a tendinopatia se apresenta como um processo cicatricial desorganizado, com ausência de células inflamatórias, baixa resposta, degeneração não-inflamatória do colágeno intratendinoso, afilamento das fibras, hiper celularidade, angiogênese dispersa e aumento dos glicosaminoglicanos interfibrilares (SHARMA e MAFFULLI,2006). Macroscopicamente, as porções afetadas do tendão perdem sua aparência normal, tornando-se escurecido e amorfo, além de perder sua espessura afilada (KAHN et al.,1999).

Já a ruptura do tendão pode ser um evento agudo, traumático ou atraumático, associado ou não a degeneração do tendão. Se agudo, se relaciona a um evento traumático, quando há predomínio de fatores extrínsecos, relacionados a sobrecarga traumática excêntrica sobre o tendão, enquanto que nas rupturas atraumáticas há associação com fatores intrínsecos. Nas rupturas atraumáticas, a tendinopatia degenerativa é o principal achado histológico. Essa degeneração tendinosa leva a diminuição

da força tênsil, favorecendo a ruptura (KANNUS e JOSZA, 1991; SHARMA e MAFFULLI,2006).

#### 2.1.9 Cicatrização do tendão

A cicatrização do tendão ocorre em três fases. Na fase inicial, inflamatória, há presença de eritrócitos e células inflamatórias, principalmente neutrófilos. Nas primeiras 24 horas, ocorre predomínio de monócitos e macrófagos, ocorrendo a fagocitose de material necrótico. Fatores vasoativos e quimioestáticos são liberados com aumento da permeabilidade vascular, iniciando a angiogênese, estimulando a proliferação e migração celular, com recrutamento de mais células inflamatórias. Tenócitos gradualmente migram para a cicatriz, e a síntese de colágeno tipo III é iniciada (OAKES,2003).

Após alguns dias, se inicia o processo de remodelamento. A síntese de colágeno tipo III alcança o ápice nesse momento, durando até seis semanas. O conteúdo de água e as concentrações de glicosaminoglicanos permanecem altas nesse estágio (OAKES,2003).

Aproximadamente após seis semanas, se inicia o processo de modelagem. Nesse estágio, o tecido cicatricial é redimensionado e remodelado. Ocorre uma diminuição da celularidade e da síntese de colágeno e de glicosaminoglicanos. Essa fase pode ser dividida em consolidação e maturação (TILLMAN e CHASAN,1996). A consolidação se inicia com seis semanas e continua até a décima semana. Nesse período, o

tecido de reparo se transforma de celular para fibrose. O metabolismo do tendão permanece alto, e os tenócitos e as fibras colágenas se alinham no sentido do estresse mecânico. Nesse momento, há uma intensa síntese de colágeno tipo I. Após dez semanas, ocorre o estágio de maturação, com modificação gradual do tecido fibrótico por tecido tendinoso cicatricial com duração de um ano. Nesse período, gradualmente ocorre diminuição do metabolismo e da vascularização do tendão (SHARMA e MAFFULLI,2005; SHARMA e MAFFULLI,2006).

A cicatrização do tendão pode ocorrer intrinsecamente, através da proliferação, no epitendão e no endotendão, dos tenócitos, ou extrinsecamente, pela invasão de células originadas da bainha sinovial. Os tenócitos contribuem para o processo de reparo intrínseco, secretando grandes quantidades de colágeno. Diferentes vias de reparo podem estar predominantes em localizações específicas. A contribuição de cada tipo celular no processo cicatricial do tendão pode ser influenciada pela etiologia da lesão, posição anatômica, presença de bainha sinovial, e quantidade de estresse induzido pelo movimento no período em que ocorre o reparo. Essa variação no fenótipo da expressão dos tenócitos ainda não foi profundamente investigada. Essa informação poderá ser extremamente útil para a melhoria das estratégias de reparo (SHARMA e MAFFULLI,2006).

### 2.1.10 Remodelação

Remodelação é um processo importante relacionado a exposição do tendão a estresses mecânicos (RILEY et al.,2002). As matrizmetaloproteinases (*MMPs*) são importantes reguladores da remodelação da MEC, e seus níveis se alteram durante o processo de cicatrização. Cicatrização e inflamação também provocam a liberação de fatores de crescimento e citocinas originadas nas plaquetas e polimorfonucleares e outras células inflamatórias (SHARMA e MAFFULLI, 2006). Esses fatores de crescimento induzem neovascularização e quimiotaxia dos fibroblastos e tenócitos estimulando a proliferação celular e a síntese de colágeno (MOLLOY et al.,2003).

## **2.2 Manguito rotador**

### **2.2.1 Anatômia, estrutura e função**

O manguito rotador é formado pelos tendões de quatro músculos que se originam na escápula e se inserem nos tubérculos do úmero, permitindo uma variedade de movimentos ao ombro. Os tendões supraespinal e infraespinal são inervados pelo nervo supraescapular, o subescapular pelo nervo subescapular e o redondo menor pelo nervo axilar (MATSEN et al., 2009).

A anatomia vascular da inserção do manguito rotador foi inicialmente descrita como uma área de relativa baixa vascularização, chamada de “zona crítica” (MATSEN et al., 2009). Porém, em contraste a esse conceito, foi demonstrado que a “zona crítica” não é menos vascularizada que outras partes do manguito rotador, e que possui inúmeras anastomoses entre os vasos tendinosos e ósseos na JOT (MATTHEWS et al., 2006). Esse fato foi confirmado com a demonstração de fluxo sanguíneo substancial na “zona crítica” de tendões do manguito rotador saudáveis utilizando laser Doppler (BENSON et al., 2010).

Suas funções básicas são: rotação da cabeça umeral em relação a escápula, estabilização da cabeça do úmero contra a cavidade glenóide e equilíbrio muscular da cintura escapular (MATSEN et al., 2009).

A exposição dos tendões do manguito rotador a cargas é complexa, mesmo em ombros saudáveis. Essas fibras mantêm tensão concêntrica quando a ação ocorre na direção do músculo, porém essas cargas tornam-se excêntricas enquanto a ação ocorre contra o movimento umeral e a direção do músculo. Isso é possível pois o manguito rotador tem ação compressiva em sua área de inserção, devido a presença de proteoglicanos e glicosaminoglicanos na sua JOT. Apesar dos tendões do manguito rotador apresentarem condições morfológicas e estruturais para tolerar os problemas criados pelo carregamento excessivo sobre eles, eles podem se degenerar em um ambiente mecânico hostil, e conseqüentemente se lesionarem (MATSEN et al.,2009; RILEY et al.,1994).

### 2.2.2 Lesão do Manguito Rotador

As lesões do manguito rotador são a causa mais comum de disfunção do ombro, podendo variar desde uma tendinopatia até rupturas maciças irreparáveis. Os pacientes com doença do manguito rotador podem se apresentar com sintomas que variam desde um mínimo desconforto, sem déficit funcional até dor intensa, fraqueza e disfunção (ENSOR,2013).

Pouca informação existe acerca da história natural das lesões do manguito rotador, sendo as rupturas assintomáticas relativamente comuns. Além disso, ainda não são compreendidas as razões pelas quais um paciente torna-se sintomático (YAMAGUCHI et al.,2001).

A etiologia da patogênese das lesões do manguito rotador inclui fatores extrínsecos ou mecânicos, tais como impacto subacromial e interno, sobrecarga tênsil ou estresse de repetição, e fatores intrínsecos ou biológicos, como hipovascularização, alterações da matriz extracelular, desorganização das fibras, perda de celularidade, degeneração hialina e fibromixóide, além de descontrole dos mecanismos de apoptose e renovação celular. (MATTHEWS et al.,2006; BENSON et al.,2010; YAMAMOTO et al., 2010; DEL BUONO et al.,2012; BEDI et al.,2012). Frequentemente, fatores mecânicos e biológicos se combinam na gênese das lesões do manguito rotador.

Portanto, são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de lesões do manguito rotador: idade, trauma e membro dominante, apesar da doença acometer indivíduos de diferentes idades e graus de atividades (MILGRAM et al.,1995; YAMAGUCHI et al.,2001). Finalmente, nos dias de hoje, na literatura, existem evidências referentes a uma predisposição genética individual para o desenvolvimento de lesões do manguito rotador (CHAUDRY e CARR,2012; MOTTA et al.,2014).

### **2.3 A Via do Fator de Crescimento Fibroblástico**

O fator de crescimento fibroblástico (*FGF*) foi descoberto em extratos pituitários em 1973, estando largamente expresso em células e tecidos (YUN et al,2010). O *FGF* ácido (*FGF1*) e básico (*FGF2*) foram originalmente

isolados do cérebro e glândula pituitária como fatores de crescimento para fibroblastos. Desde então, pelo menos 22 distintos *FGFs* tem sido identificados e isolados (KATOH e KATOH,2006).

Por análise filogenética, a família do gene *FGF* humano pode ser dividida em sete subfamílias, e está ilustrada na figura 2 (ITOH,2007).

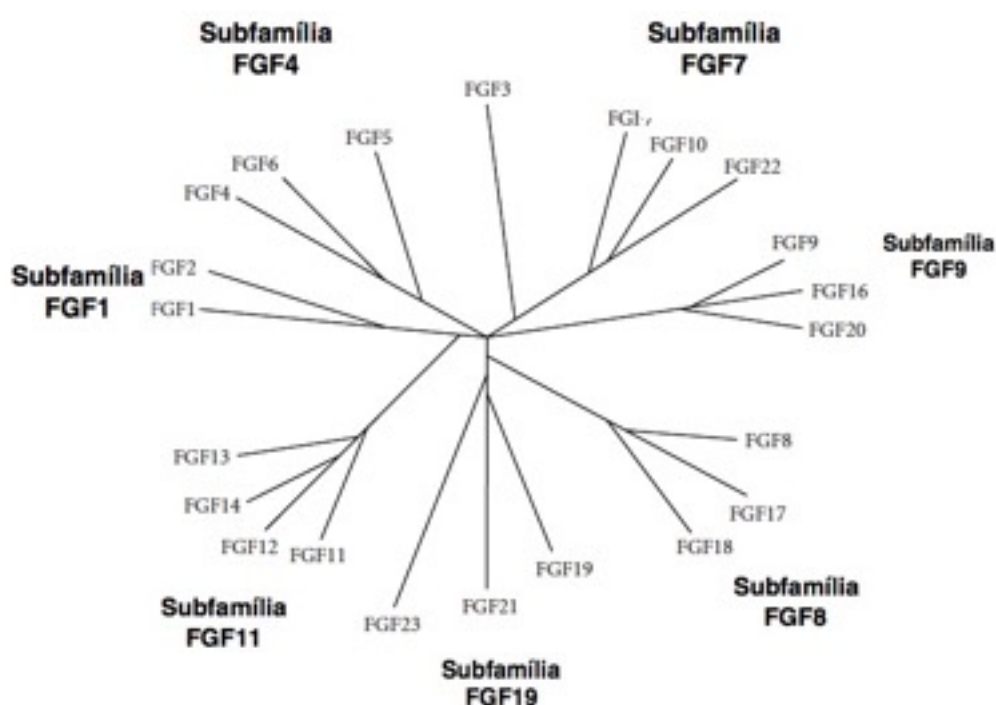


Figura 2 Árvore filogenética da família *FGF* humana: A família *FGF* humana pode ser dividida em sete subfamílias de dois a quatro membros cada. O tamanho da ramificação corresponde a distância evolutiva entre cada gene (Modificado de YUN et al, 2010).

### 2.3.1 Função do FGF

*FGF* exerce sua função por união aos receptores *FGF* (*FGFR*), regulando inúmeras vias do desenvolvimento durante o período embrionário (YUN, 2010). A família *FGF* é composta de 18 ligantes que agem através de quatro receptores tirosina quinase transmembrana conservados (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* e *FGFR4*) (TURNER e GROSE,2010). Os quatro *FGFRs* contém um domínio extracelular ligante com três domínios imunoglobulina (I, II e III), um domínio transmembrana e um domínio tirosina-quinase intracelular (JAYE et al.,1992). *FGFRs* são expressos em variados tipos celulares e são fundamentais para a regulação celular, proliferação, diferenciação e sobrevivência, o que faz a via *FGF* ser alvo de células cancerosas (ESWARAKUMAR et al.,2005).

Os *FGFRs* ativados controlam a cascata de sinalização através do recrutamento de moléculas específicas, que se unem à tirosina fosforilada na região citosólica do receptor, disparando inúmeras vias de sinalização que conduzem a respostas específicas celulares por meio de uma cascata de eventos de fosforilação (SCHLESSINGER,2000). As três principais vias de sinalização ativadas por *FGF* são: *RAS/MAP quinase (MAPK)*, *fosfatidilinositida 3-kinase (PI3 quinase/AKT)* e *PLC*. A interação *FGF/FGFR* tem sido minuciosamente estudada e foi, recentemente descrita (GOETZ e MOHAMMADI,2013).

### 2.3.2 Vias de sinalização dos FGFs

A conexão do *FGF* ao receptor *FGFR* induz a dimerização do *FGFR* na membrana celular, expõe o domínio intracelular tirosina quinase para iniciar a cascata de fosforilação, gerando diferentes respostas celulares, como proliferação, sobrevivência ou mobilidade celular (GOETZ e MOHAMMADI, 2013).

Na via de sinalização que proporciona proliferação celular, o *FGF* se liga ao *FGFR* na membrana celular. O substrato intracelular do *FGFR* é ativado, e se liga a proteína adaptadora *GRB2*. Essa ligação estimula um grupo de genes (*son of sevenless* - *SOS*) que irá codificar os fatores modificadores do nucleotídeos guanina pertencente a subfamília *RAS* (*RAS GTPase*). Esse evento inicia a cascata *MAPK*. O *MAPK* ativado se transloca do citoplasma para o núcleo, onde é fosforilado, ativando os fatores de transcrição gênica. Essa via, além de resultar em proliferação celular, também pode produzir diferenciação, migração ou outra resposta celular (GOETZ e MOHAMMADI, 2013). Há evidência de que a via do *FGF* atua em tenócitos, através da ativação da via *MAPK* regulando a síntese e proliferação de MEC (CAI et al., 2013).

Quando o *FGFR2a* ativado ligado a proteína adaptadora *GRB2* se associa a proteína 1 (*GAB1*), promove a ativação de *AKT quinase* mediada por *PI3K*, no meio citoplasmático. Essa cascata de eventos inativa os fatores pró-apoptóticos, tais como *BAD* e *FOXO*, promovendo sobrevivência celular (GOETZ e MOHAMMADI, 2013). A via *AKT quinase* parece estar envolvida

na gênese da atrofia muscular em tendões rotos do manguito rotador (CAI et al.,2013).

A última via de sinalização do *FGF* descrita ocorre quando a ligação *FGF-FGFR* recruta a fosforilação de *PLC*, que ao ser ativada catalisa a hidrólise do fosfolípídeo transmembrana em diacilglicerol (*DAG*) e trifosfato inositol (*IP3*). O *DAG* ativa a proteína C quinase (*PKC*), a qual ativa seu substrato por fosforilação, incluindo *MARCKS*, um substrato quinase, regulador da motilidade celular. *IP3* estimula a liberação de íons cálcio do meio intracelular, e ativa proteínas cálcio-dependente, tais como calcineurina fosfatase, que induz a translocação nuclear dos fatores de transcrição ativados por células T (*NFAT*), que estimulam a expressão de proteínas essenciais para a motilidade celular (GOETZ e MOHAMMADI,2013). A importância dessa via não está bem clara, uma vez que sua ausência não impede a ocorrência da mitogênese e diferenciação celular, contudo há sugestão de que essa via seja necessária para a adesão celular em células neurais (YUN et al.,2010). Não há estudos que investiguem essa via em tendões.

A complexa interação intracelular que origina variados eventos químicos e moleculares, promove inúmeras funções associadas aos *FGFs*, em variados tipos celulares e tecidos. O quadro 1 resume essas funções.

Quadro 1 - Funções dos fatores de crescimento fibroblástico.

| Função                | Subfamília relacionada a função                                                    | Célula alvo                                                                                                                                                                               |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Proliferação celular  | <i>FGF1, FGF2</i><br><br><i>FGF4</i><br><br><i>FGF7, FGF10</i><br><br><i>FGF18</i> | Pré-adipócito<br>Célula endotelial, Célula epitelial<br>Célula fibroblásto, célula tronco neural<br>Célula tronco trofoblasto<br>Célula epitelial<br>Osteoblasto, condrócito, osteoclasto |
| Migração celular      | <i>FGF2</i><br><br><i>FGF4</i><br><br><i>FGF7</i><br><br><i>FGF8</i>               | Astrócito, célula miogênica<br><br>Célula miogênica<br><br>Célula epitelial<br><br>Célula da crista neural                                                                                |
| Diferenciação celular | <i>FGF1, FGF2</i><br><br><i>FGF7</i><br><br><i>FGF20</i>                           | Neuroepitelial<br><br>Queratinócito<br><br>Célula tronco de macacos                                                                                                                       |
| Angiogênese           | <i>FGF1, FGF2</i>                                                                  | Célula endotelial                                                                                                                                                                         |

Fator de crescimento fibroblástico (*FGF*) (YUN et al,2010).

### 2.3.3 *FGF* em tendões e músculos

Das diversas formas existentes de *FGFs*, o *FGF 2* ou *bFGF* e o *FGF1* são potentes estimuladores da proliferação fibroblástica, síntese de colágeno e formação de tecido de granulação (HARWOOD et al.,1976). Os efeitos do *FGF2* têm sido principalmente estudados em relação as lesões de tendão, onde sua administração tem apresentado efeitos positivos no processo de

cicatrização (DUFFY et al.,1995; CHAN et al.,2000). Também foi demonstrado que a expressão do *FGF2* está presente em tendões normais intactos, mas está intensamente inalterado em tendões lesionados (CHANG et al.,1998). As ações fisiológicas dos FGFs estão relacionadas no quadro 2.

O estímulo mecânico é indutor da liberação de *FGF*, *in vitro*, em células de músculo esquelético, e esse aumento de *FGF* pode ser inibido pela administração de anticorpos neutralizantes da atividade do *FGF* (CLARKE e FEEBACK,1996). Além disso, foi demonstrado que o *FGF 2* estimula a conexina 43, que é conhecida por se localizar nos espaços comunicantes entre os fibroblastos de tendões. Isso sugere que o *FGF* atua na comunicação intercelular, convertendo o estímulo mecânico em atividade bioquímica, propiciando a reestruturação da matriz extracelular (DOBLE e KARDAMI,1995). Parte da ação do *FGF* é modulada via *PDGF*, que é conhecida por estimular a síntese de procolágeno, tendo sido demonstrado que a combinação de *FGF2* e *PDGF* resulta em grande aumento da síntese de DNA em fibroblastos sinoviais (HAMILTON et al.,1994; BISHOP et al., 1998). Por fim, também foi demonstrado que o *FGF2* inibe os efeitos do *IGF-1* e de *TGF- $\beta$*  na síntese de colágeno II em condrócitos (DESAI,2001).

Os *FGFs* desenvolvem importante função na angiogênese e mitogênese de células mesenquimais, podendo atuar ativamente na modulação do reparo tecidual no manguito rotador. Vários modelos tem sido sugeridos objetivando aprimorar a cicatrização do tendão através da aplicação de *FGF-básico* (*FGF2*), demonstrando significativo aumento da resistência na êntese e maturidade dos tendões em ratos (CHAN et al.,2000; TAKAHASHI et al.,2002; TANG et al,2008).

As citocinas da família *FGF* podem modular a cicatrização após o reparo de lesões do manguito rotador. Alterações estruturais na síntese e controle do colágeno são observados em tendões rotos e podem representar uma lenta resposta de reparo durante o processo de lesão. *FGF3* e *FGF10* interagem com o *FGFR1* e promovem diversas funções biológicas, *in vivo* e *in vitro*, incluindo mitogênese, migração celular, diferenciação, angiogênese e cicatrização tecidual. Além disso, os *FGFs* tem sido utilizados na regeneração de tecidos danificados como: músculo, tendão, ligamento, cartilagem e osso (GARAFOLO et al.,2011; CHAUDHURY e CARR,2012; BEDI et al.,2012).

## **2.4 Genética na lesão do Manguito Rotador**

Inicialmente, é necessário enfatizar que existe uma variedade de doenças dos tecidos musculoesqueléticos que apresentam um componente genético. (SEPTEMBER et al.,2007) Em um extremo estariam as doenças Mendelianas clássicas, em que os fatores genéticos são os principais determinantes da gravidade e prognóstico da doença, como ocorre na Osteogênese imperfeita, Síndrome de Ehlers-Danlos e Síndrome de Marfan. De forma oposta, estariam as condições complexas, de origem multifatorial, em que o desenvolvimento da doença é determinado pela interação entre genética e ambiente, podendo ser chamadas de interações gene-gene ou gene-ambiente, em que se encontram as tendinopatias e rupturas tendinosas (SEPTEMBER et al.,2007).

A existência de um componente genético relacionado à fisiopatologia das tendinopatias tem sido confirmada, acometendo o tendão de Aquiles e o manguito rotador (HARVIE et al.,2004; MOKONE et al.,2005; MOKONE et al., 2006; MOTTA et al.,2014). Polimorfismos nos genes do *colágeno 5 (COL5A1)* e da *tenascina-C (TNC)* foram associados a lesões do tendão de Aquiles na população (MOKONE et al.,2005; MOKONE et al.,2006).

A associação entre genética e lesões do manguito rotador, foi identificada, através da demonstração da alta correlação entre a existência de lesão do manguito rotador em gêmeos (HARVIE et al.,2004; TASHJIAN et al., 2009). Na população brasileira, foi identificado que o polimorfismo em *FGFR1 rs13317* se relaciona com o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento da lesão do manguito rotador. Assim, a presença do alelo T aumentou em três vezes o risco de ter lesão do manguito rotador. Além disso, esse mesmo estudo, identificou relação entre o polimorfismo do gene *FGF10* e do haplótipo *FGF3 CGACG* com a lesão do manguito rotador. Sendo assim, é possível que mutações no gene *FGF* favoreçam um mecanismo inadequado de reparo do tendão (MOTTA et al.,2014).

Por outro lado, poucos estudos, até o momento, relatam a expressão de genes de fatores relacionados a degeneração e regeneração tendínea na lesão do manguito rotador, como *PPAR*, *MYF-5*, *FOXO*, *HIF-1*, *VEGF*, *BNip3*, *TUNEL*, *TNF*, *TIMP*, *MMP* (FREY et al.,2009; SCHMULTZ et al.,2009; BENSON et al.,2010; LAKEMEIER et al.,2010; SHINDLE et al.,2011).

### 2.4.1 Aplicações clínicas dos estudos genéticos

Os resultados das reconstruções tendinosas são variáveis. Apesar da evolução das técnicas cirúrgicas e protocolos terapêuticos, a reprodução dos resultados satisfatórios permanece difícil, assim como a recuperação da condição prévia do tendão, existindo uma permanente alteração de características físicas como: força, resistência, elasticidade, organização e composição (HOGAN et al.,2011).

Apesar do grande número de procedimentos terapêuticos disponíveis para o tratamento das lesões de tendão, muito poucos oferecem evidência científica para auxiliar o médico assistente (MATSEN et al.,2009). Dessa forma, estudos genéticos podem oferecer nova oportunidade para o tratamento das lesões de tendão. Engenharia tecidual é a aplicação dos princípios biológicos, químicos e de engenharia no reparo, recuperação ou regeneração de tecidos vivos, usando biomateriais, células e fatores, isoladamente ou em combinação, representando uma nova fronteira no tratamento das doenças musculotendinosas. Da mesma forma, a terapia gênica envolve a transferência de genes para o paciente propiciando a transcrição de proteínas sadias, envolvidas no processo de reparo dos tendões. Ambas as técnicas encontram-se em evolução, representando uma nova fronteira terapêutica no tratamento das lesões de tendão (EVANS et al., 2005; HOGAN et al.,2011).

Devido as suas potenciais funções biológicas, os *FGFs* tem sido utilizados na regeneração de diversos tecidos danificados (YUN et al.,2010).

As funções dos FGFs estão descritas no quadro 2. De fato, o *FGF* vem sendo administrado diretamente sobre os tecidos doentes, juntamente com outros fatores de crescimento, porém os *FGFs* livres são rapidamente degradados *in vivo*, levando a perda da atividade biológica e função. Para melhora da sua efetividade, os *FGFs* devem ser absorvidos localmente ou encapsulados biologicamente com materiais para garantir a manutenção da atividade biológica, porém o uso terapêutico dos *FGFs* permanece um desafio (YUN et al.,2010).

O uso de fatores de crescimento através de terapia genética e associação com membranas tem favorecido a cicatrização em tendões lesionados. Alternativamente, os fatores de crescimento tecidual podem ser usados na indução de células progenitoras locais, a se diferenciarem em tenócitos ou fibroblastos, estimulando a cicatrização (CHANG et al.,1998). A terapia gênica com fator de diferenciação de crescimento *GDF-5* demonstrou aumento na força de resistência do tendão de Aquiles de ratos, sem induzir a formação de osso ou cartilagem, durante a cicatrização do tendão (BOLT et al.,2007). O uso de *GDF-5* diminuiu a expressão de genes inflamatórios e aumentou a organização das fibras de colágeno em tendões de Aquiles, em murinos (KELLER et al.,2011). Já o uso de hormônio recombinante *GDF-7* em esponjas de colágeno estimulou a cicatrização acelerada em tendões do manguito rotador de cobaias (SEEHERMAN et al.,2008). Estes estudos representam modelos terapêuticos que podem ser melhorados no tratamento de lesões de tendões, sendo necessária uma evolução na compreensão das alterações dos produtos proteicos, com base na expressão de RNAm sintetizados pelos tenócitos em regiões de lesão.

Quadro 2: Efeitos fisiológicos dos fatores de crescimento fibroblásticos e sua aplicação terapêutica.

| <b>Gene</b>  | <b>Localização</b> | <b>Receptor</b>                      | <b>Aplicação terapêutica</b> |
|--------------|--------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>FGF1</i>  | <i>5q31,3</i>      | <i>FGFR1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c, 4</i> | Doença cardiovascular        |
| <i>FGF2</i>  | <i>4q27</i>        | <i>FGFR 1b, 1c, 2c, 3c, 4</i>        | Doença cardiovascular Câncer |
| <i>FGF3</i>  | <i>11q13,3</i>     | <i>FGFR 1b, 2b</i>                   | indeterminado                |
| <i>FGF4</i>  | <i>11q13,3</i>     | <i>FGFR 1c, 2c, 3c, 4</i>            | Angina estável               |
| <i>FGF5</i>  | <i>4q21,21</i>     | <i>FGFR 1c</i>                       | crescimento capilar          |
| <i>FGF6</i>  | <i>12q13,32</i>    | <i>FGFR 1c, 2c, 4</i>                | Mucosite oral                |
| <i>FGF7</i>  | <i>15q21,2</i>     | <i>FGFR2b</i>                        | indeterminado                |
| <i>FGF8</i>  | <i>10q24,32</i>    | <i>FGFR 3c, 4</i>                    | indeterminado                |
| <i>FGF9</i>  | <i>13q12,11</i>    | <i>FGFR 2c, 3b, 3c, 4</i>            | indeterminado                |
| <i>FGF10</i> | <i>5p12</i>        | <i>FGFR 1b, 2b</i>                   | indeterminado                |
| <i>FGF11</i> | <i>17p13,1</i>     | <i>intracitoplasmático</i>           | indeterminado                |
| <i>FGF12</i> | <i>3q28</i>        | <i>não identificado</i>              | indeterminado                |
| <i>FGF13</i> | <i>Xq26,3</i>      | <i>não identificado</i>              | indeterminado                |
| <i>FGF14</i> | <i>13q33,1</i>     | <i>não identificado</i>              | indeterminado                |
| <i>FGF16</i> | <i>Xq21,1</i>      | <i>FGFR4</i>                         | indeterminado                |
| <i>FGF17</i> | <i>8p21,3</i>      | <i>FGFR 2c, 3c, 4</i>                | indeterminado                |
| <i>FGF18</i> | <i>5q35,1</i>      | <i>FGFR 2c, 3c, 4</i>                | Osteoartrite                 |
| <i>FGF19</i> | <i>11q13,3</i>     | <i>FGF4</i>                          | Diabetes                     |
| <i>FGF20</i> | <i>8p22</i>        | <i>não identificado</i>              | Parkinson                    |
| <i>FGF21</i> | <i>19q13,32</i>    | <i>não identificado</i>              | Diabetes                     |
| <i>FGF22</i> | <i>19p13,3</i>     | <i>FGFR 2b</i>                       | indeterminado                |
| <i>FGF23</i> | <i>12p13,32</i>    | <i>FGFR 3c</i>                       | Hipofosfatemia               |

FGF (Fator de crescimento fibroblástico), FGFR (Receptor do fator de crescimento fibroblástico (YUN et al, 2010)).

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

- Investigar a expressão dos membros da família do fator de crescimento fibroblástico (*FGF*) em tendões supraespinais com ruptura em pacientes com doença do manguito rotador.
- Comparar os resultados da expressão dos membros da família do fator de crescimento fibroblástico (*FGF*) em tendões supraespinais com ruptura em pacientes com doença do manguito rotador com tendões semitendinosos íntegros de pacientes sem doença do manguito rotador.

#### 3.2 Objetivos específico

- Realizar a caracterização dos tenócitos nas células cultivadas dos descartes tendíneos nos grupos de LMR e controle.

## **4 Material e Métodos**

O protocolo clínico, radiográfico e laboratorial deste trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO) sob o número 0024.0.305.000-11 (Anexo I).

### **4.1. População elegível**

Foram incluídos no grupo de estudo, pacientes atendidos no Centro de Cirurgia do Ombro e Cotovelo do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (CCOC-INTO) e diagnosticados com lesão do manguito rotador, através de exame clínico específico da articulação do ombro sintomático associada a avaliação da imagem de ressonância magnética. (Anexo II) Todos os pacientes incluídos no grupo de estudo tinham idade entre 40 e 65 anos, apresentavam lesão atraumática e crônica do manguito rotador, com evolução dos sintomas superior há três meses, refratários ao tratamento clínico, com indicação de reconstrução cirúrgica do manguito rotador. Figura 3. Esses pacientes foram submetidos a tratamento cirúrgico da lesão do manguito rotador por técnica aberta, sendo, durante o procedimento, realizada a coleta do descarte cirúrgico do coto do tendão roto, e enviado ao laboratório do Centro de Terapia Celular (CTCel) do INTO, para

processamento e análise da expressão gênica. Foram excluídos do estudo os pacientes com lesões traumáticas do manguito rotador, com doenças imunológicas e/ou usuários crônicos de corticoesteróides tópico e sistêmico, pois são condições relacionadas com alterações estruturais dos tendões. Os dados clínicos pré-operatórios dos pacientes com lesão do manguito rotador estão descritos na tabela 1.

O grupo controle foi constituído por pacientes em tratamento no Centro de Cirurgia do Joelho (CCJ) do INTO, que foram submetidos a reconstrução ligamentar com enxerto tendinoso autólogo de semitendinoso, apresentando ausência de sinais e sintomas compatíveis com lesão no manguito rotador. Uma vez que o tendão semitendinoso ipsilateral foi selecionado como enxerto para a reconstrução ligamentar do joelho, admitiu-se que se tratavam de tendões saudáveis, ideais para comparação com tendões rotos. Os dados clínicos pré-operatórios do grupo controle estão descritos na tabela 2.

Para serem incluídos no estudo, os pacientes em tratamento de doença do manguito rotador pelo CCOC e de instabilidade do joelho pelo CCJ do INTO foram convidados a participar do estudo, independente da continuidade do seu tratamento na instituição. Ao aceitarem, todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo III), esclarecendo os riscos e benefícios do estudo, e a possibilidade de abandono da participação no estudo sem qualquer ônus individual.



Figura 3: Imagem de ressonância magnética de lesão do manguito rotador: corte coronal oblíquo de uma imagem de ressonância magnética do ombro do paciente no.8 do grupo de estudo demonstrando a ruptura do tendão supraespinal (seta) confirmando critério de seleção para inclusão no estudo (INTO).

Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes com lesão do manguito rotador.

| <i>caso</i> | <i>Idade</i> | <i>sexo</i> | <i>Etnia</i> | <i>Tabagismo</i> | <i>medicação</i>                  | <i>Comorbidades</i> |
|-------------|--------------|-------------|--------------|------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 1           | 58           | Feminino    | Caucasiana   | sim              | não                               | DM                  |
| 2           | 61           | Masculino   | Caucasiana   | não              | não                               | não                 |
| 3           | 60           | Feminino    | Caucasiana   | não              | Anti-hipertensivo                 | HAS                 |
| 4           | 58           | Feminino    | Parda        | sim              | Anti-hipertensivo                 | HAS                 |
| 5           | 77           | Feminino    | Parda        | não              | Miorelaxante<br>Anti-hipertensivo | HAS                 |
| 6           | 71           | Feminino    | Parda        | não              | Miorelaxante                      | não                 |
| 7           | 58           | Feminino    | Caucasiana   | não              | não                               | não                 |
| 8           | 61           | Feminino    | Parda        | não              | não                               | não                 |
| 9           | 67           | Feminino    | Caucasiana   | não              | não                               | não                 |
| 10          | 65           | Feminino    | Caucasiana   | sim              | não                               | não                 |
| 11          | 60           | Feminino    | Caucasiana   | não              | não                               | não                 |
| 12          | 73           | Feminino    | Caucasiana   | não              | Anti-hipertensivo                 | HAS                 |
| 13          | 60           | Masculino   | Parda        | não              | não                               | não                 |
| 14          | 60           | Masculino   | Caucasiana   | não              | não                               | não                 |
| 15          | 63           | Feminino    | Parda        | não              | não                               | não                 |
| 16          | 65           | Feminino    | Parda        | não              | não                               | não                 |
| 17          | 68           | Feminino    | Caucasiana   | não              | Anti-hipertensivo                 | HAS, DM             |
| 18          | 62           | Feminino    | Caucasiana   | não              | não                               | não                 |
| 19          | 64           | Feminino    | Parda        | não              | não                               | não                 |
| 20          | 58           | Feminino    | Caucasiana   | não              | Anti-hipertensivo                 | HAS                 |
| 21          | 60           | Masculino   | Caucasiana   | não              | Anti-hipertensivo                 | HAS, DM             |
| 22          | 59           | Masculino   | Caucasiana   | não              | Anti-hipertensivo                 | HAS, DM             |
| 23          | 66           | Feminino    | Caucasiana   | não              | Anti-hipertensivo                 | HAS                 |
| 24          | 61           | Feminino    | Caucasiana   | não              | não                               | não                 |
| 25          | 73           | Feminino    | Parda        | não              | não                               | não                 |
| 26          | 58           | Masculino   | Caucasiana   | sim              | não                               | não                 |
| 27          | 57           | Masculino   | Caucasiana   | não              | não                               | não                 |
| 28          | 56           | Masculino   | Caucasiana   | não              | não                               | DM                  |
| 29          | 59           | Feminino    | Caucasiana   | sim              | Anti-hipertensivo                 | HAS                 |
| 30          | 61           | Masculino   | Caucasiana   | não              | Miorelaxante                      | não                 |
| 31          | 68           | Masculino   | Caucasiana   | não              | não                               | não                 |

HAS: Hipertensão arterial sistêmica; DM: Diabetes Mellitus.

Tabela 2: Dados clínicos do grupo controle.

| <i>Identificação</i> | <i>Idade</i> | <i>Gênero</i> | <i>Etnia</i> | <i>Tabagismo</i> | <i>Uso de<br/>medicação</i> | <i>Comorbidades</i> |
|----------------------|--------------|---------------|--------------|------------------|-----------------------------|---------------------|
| <b>1</b>             | 40           | Masculino     | Caucasiana   | não              | não                         | não                 |
| <b>2</b>             | 42           | Feminino      | Caucasiana   | não              | não                         | não                 |
| <b>3</b>             | 37           | Masculino     | Caucasiana   | não              | não                         | não                 |
| <b>4</b>             | 43           | Feminino      | Parda        | não              | não                         | não                 |
| <b>5</b>             | 24           | Masculino     | Parda        | não              | não                         | não                 |
| <b>6</b>             | 37           | Masculino     | Caucasiana   | não              | não                         | não                 |
| <b>7</b>             | 30           | Feminino      | Caucasiana   | não              | não                         | não                 |
| <b>8</b>             | 42           | Masculino     | Caucasiana   | não              | não                         | não                 |
| <b>9</b>             | 36           | Feminino      | Caucasiana   | não              | não                         | não                 |
| <b>10</b>            | 39           | Masculino     | Caucasiana   | não              | não                         | não                 |

#### 4.2 Coleta do tendão

Grupo controle: as amostras de tendão semitendinoso foram obtidas a partir de descarte cirúrgico do coto do autoenxerto desse tendão, retirado no ato operatório dos pacientes submetidos a reconstrução do ligamento cruzado anterior pelo CCJ do INTO, do joelho ipsilateral (protocolo aprovado sob o número CEP 20057/92). A amostra do tecido foi enviado ao CTCel para imediato processamento.

Grupo LMR: após a confirmação diagnóstica ambulatorial de LMR, os pacientes foram submetidos a tratamento cirúrgico através de reconstrução aberta da lesão do tendão supraespinal e, durante o ato operatório, o descarte cirúrgico da margem rota desse tendão foi enviado ao CTCel para imediato processamento.

### **4.3 Processamento das Amostras**

Os descartes de tendão foram coletados de 41 participantes do estudo, sendo 31 do grupo LMR e dez do grupo controle.

Os descartes tendíneos foram imediatamente lavados com solução salina e fragmentados. Após dissecação do tecido, o material foi incubado em tripsina 0,5% na temperatura de 38°C por 30 minutos com agitação a cada dois minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 836g por cinco minutos a 8°C, e incubadas em colagenase 2,5% em temperatura de 37°C. As amostras foram então lavadas com solução salina 1x e centrifugadas a 836g. O procedimento foi realizado duas vezes. As células foram então ressuspensas em meio ISCOVES acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica de estreptomicina/penicilina e fungicida (Sigma-Aldrich A595, St. Louis, MO), filtradas em membrana de 70µm e plaqueadas em placas de 24 poços na proporção de 100mg de tecido por poço. Após o plaqueamento, as células foram expandidas até a segunda passagem e, então, congeladas em nitrogênio líquido para extração do RNA e análise da expressão gênica.

### **4.4 Extração do RNA e análise da expressão gênica**

O RNA total obtido a partir das amostras das células tendíneas foi isolado utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen™ por Life Technologies, Nova Iorque, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Foi realizado tratamento com DNase, para digerir o DNA genômico que poderia levar a falsos resultados positivos. (Ambion por Invitrogen™ pela Life Technologies, NY, EUA). A integridade do RNA foi confirmada em corrida de eletroforese, utilizando gel de agarose a 1,2%, corado com SYBR Stain® (Invitrogen™ pela Life Technologies, NY, EUA). A pureza do RNA foi confirmada com a razão das absorvâncias 260/280 em espectrofotômetro, e a quantidade de RNA foi estimada a 260 nm (Nanodrop® 1000, Thermo Scientific, Wilmington, EUA).

Em seguida, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA), a partir de 300 ng de RNA utilizando o ensaio de transcriptase reversa (RT), pelo sistema ImProm-II Transcrição Reversa System™ (Promega Corporation, Wisconsin, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante.

A reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR) foram realizadas no aparelho LineGene 9660 (Bioer Technology, Binjiang, China), utilizando o sistema de detecção rápida SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com 1,5 ul de cDNA em cada reação. O qPCR foi realizado nas seguintes condições: 95° C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação e polimerização (95° C durante 15 segundos, 60° C durante 1 minuto e 72°C por 30 segundos), acrescidos da curva de Melting para análise do padrão de fluorescência do SYBR nas reações (95°C por 15 segundos, 60°C 30 segundos e 95°C 15 segundos).

O controle do branco (RT-PCR, sem matriz de RNA) e as reações RT (reações de PCR sem a transcrição reversa) foram executadas juntamente com todos os RT-PCRs.

Para caracterização fenotípica dos tenócitos, foi desenhado um painel de marcadores, conforme apresentado na tabela 3, constituído pelos genes que codificam o *colágeno tipo I* (*COL1A1*), *esclerose* (*SCX*), *tendomodulina* (*TNMD*) e *fibromodulina* (*FMOD*), a partir de uma amostra representativa (WANG et al.,2005; DOCHEVA et al.,2005; BI et al.,2007; BUSTIN et al.,2009; KLATTE et al.,2010).

Iniciadores específicos para os genes *FGF2*, *FGF3*, *FGF10*, *FGFR1*, *FGFR2*, foram confeccionados com base nos dados do BLAST (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>), descritos na tabela 4. O Método Livak ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) foi utilizado para determinar a quantificação relativa da expressão dos genes estudados. Os valores foram normalizados em relação à expressão constitutiva de *GAPDH*. Duas séries de experimentos foram realizados para cada amostra de tecido para assegurar a reprodutibilidade. Os dados são apresentados com a variação relativa de dobragem de um calibrador (pool de RNA a partir de todas as amostras). Todas as reações foram realizadas em duplicata contendo informações essenciais de acordo com Bustin et al. (2009).

Tabela 3: Sequência dos inicializadores utilizados para a caracterização dos tenócitos pela análise de expressão gênica.

| GENE                                    | SENDO                      | REVERSO                     |
|-----------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <b>Colágeno I</b><br>( <i>COL1A1</i> )  | GTG CTC CTG GTA TTG CTG GT | GCT CTC CCT TAG CAC CAG TGT |
| <b>Tendomodulina</b><br>( <i>TNMD</i> ) | GGT GGT CCC TCAAGT GAAAG   | CCT CGA CGG CAG TAAATA CAA  |
| <b>Scleraxis</b><br>( <i>SCX</i> )      | CTG GCC TCC AGC TAC ATC TC | GCG AAT CGC TGT CTT TCT GT  |
| <b>Fibromodulina</b><br>( <i>FMOD</i> ) | CAA CAC CTT CAA TTC CAG CA | CTG CAG CTT GGA GAA GTT CA  |

G (Guanina), T (Timina), C (citosina), A (adenina) (WANG et al., 2005; DOCHEVA et al., 2005; BI et al., 2007; KLATTE et al., 2010).

Tabela 4: Sequência dos inicializadores utilizados para análise da expressão dos genes FGF.

| GENE         | SENDO                     | REVERSO                  |
|--------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>FGF2</b>  | TGCCCAGTTCGTTTCAGTG       | CTGGCTATGAAGGAAGATGGA    |
| <b>FGF3</b>  | CGGCACCCTGGAGAACAGCGCCTA  | TGCCCAGGTACCGCCCGGAGAAGA |
| <b>FGF10</b> | CCTGCTGGATTACATTAAAGCACTG | GTCAAGGGCATATCCAACAACAAC |
| <b>FGFR1</b> | ATGTGCCGTACTATTCTCCACA    | AACCTGACCACAGAATTGGAGGCT |
| <b>FGFR2</b> | GTAGCCTCCAATGCGATGC       | GTCAGTGAGAACAGTAACAACAAG |

T (Timina), G (Guanina), C (Citocina), A (Adenina), FGF (Fator de crescimento fibroblástico) (BUSTIN et al., 2009).

#### 4.5 Avaliação estatística

O tamanho da amostra necessária para um estudo com 80% de poder foi calculado usando uma calculadora on-line em <http://statpages.org/proppowr.html>, assim como o tamanho da amostra representativa para fenotipagem dos tenócitos. As variáveis nominais foram expressas em frequências e percentuais. Para acessar o significado das variáveis nominais entre os grupos, foi realizado o teste do qui-quadrado ( $X^2$ ). As variáveis contínuas foram expressas como média e desvio padrão. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a distribuição entre as variáveis. A análise de variância foi realizada utilizando (ANOVA)/teste t-Test ou Mann-Whitney para comparação das médias entre os grupos, quando a variável estava em uma distribuição normal ou não-normal, incluindo a análise de expressão gênica após o cálculo pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no programa Stata 11.1 (StataCorp, Texas EUA)

## 5 Resultados

### 5.1 Resultados Clínicos

A tabela 5 apresenta os dados demográficos e clínicos dos indivíduos incluídos no estudo. No total, 41 voluntários foram avaliados, sendo 31 no grupo de LMR e 10 no controle, sendo 25 (61%) mulheres e 16 (39%) homens. A média de idade do grupo de casos de LMR foi de 61 anos, e do controle de 37 anos. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos controle e LMR considerando a etnia, sexo, hábito tabagista, presença de diabetes e artrite reumatoide. No entanto, voluntários com LMR apresentaram maior média de idade ( $p<0.001$ ), maior incidência de hipertensão ( $p=0.03$ ) e, portanto, uso de hipertensivos ( $p=0.03$ ).

Tabela 5: Dados demográficos e clínicos dos 41 participantes do estudo.

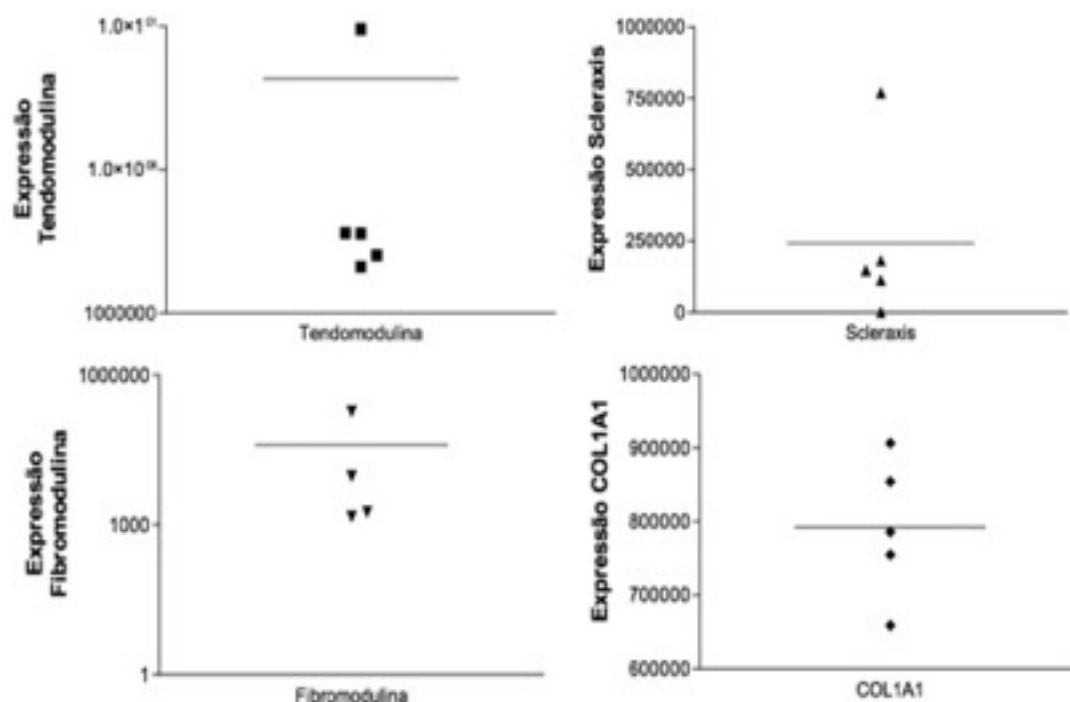
|                      | Total<br>(n= 41) | LMR<br>(n= 31) | Controle<br>(n= 10) | P-valor       |
|----------------------|------------------|----------------|---------------------|---------------|
|                      | n (%)            | n (%)          | n (%)               |               |
| Etnia                |                  |                |                     |               |
| Caucasiano           | 30 (73)          | 22 (71)        | 8 (80)              | <b>0.45</b>   |
| Não-Caucasiano       | 11 (27)          | 9 (29)         | 2 (10)              |               |
| Idade (anos)         | 57±11.6          | 61±8           | 37.1±7              | <b>0.0001</b> |
| Gênero               |                  |                |                     |               |
| Feminino             | 25 (61)          | 21 (65.6)      | 4 (40)              | <b>0.11</b>   |
| Masculino            | 16 (39)          | 10 (34.4)      | 6 (60)              |               |
| Hábito Tabagista     |                  |                |                     |               |
| Não-fumante          | 36 (87.8)        | 26 (83.9)      | 10 (100)            | <b>0.22</b>   |
| Fumante              | 5 (12.2)         | 5 (16.1)       | 0 (0)               |               |
| Uso de medicação     |                  |                |                     |               |
| Relaxante muscular   | 3 (7.3)          | 3 (9.6)        | 0 (0)               | <b>0.42</b>   |
| Anti-hipertensivo    | 10 (23.8)        | 10 (31.2)      | 0 (0)               | <b>0.03</b>   |
| Doença sistêmica     |                  |                |                     |               |
| Diabetes             | 5 (12.2)         | 5 (15.6)       | 0 (0)               | <b>0.22</b>   |
| Hipertensão arterial | 10 (23.8)        | 10 (31.2)      | 0 (0)               | <b>0.03</b>   |

IC = Intervalo de confiança.

## 5.2 Caracterização dos Tenócitos

A expressão gênica de tendomodulina, colágeno tipo I, esclerose e fibromodulina, confirmou o fenótipo para os tenócitos na amostra representativa (12%), obtida a partir do total de células cultivadas dos descartes tendíneos nos grupos controle e LMR, com expressão detectável em todas as amostras analisadas. (Gráfico 1)

Gráfico 1: Resultado da caracterização dos tenócitos.



Expressão detectável dos genes característicos do fenótipo tenocítico:  
Tendomodulina, Esclerose, Fibromodulina e COL1A1 (colágeno I).

### 5.3 Resultados da expressão dos fatores de crescimento fibroblásticos

De forma a suportar a potencial associação entre o fator de crescimento fibroblástico com o desenvolvimento da lesão do manguito rotador, foram investigados 5 genes (*FGF2*, *FGF3*, *FGF10*, *FGFR1*, *FGFR2*) integrantes da via *FGF*. Do total de amostras, 87.8% (36 amostras) tiveram expressões do RNAm detectáveis. A expressão de *FGF2* ( $p=0,001$ ), *FGF3* ( $p=0,002$ ), *FGF10* ( $p=0,001$ ), *FGFR1* ( $p=0,0007$ ) foi significativamente menor nos pacientes com LMR quando comparados ao controle. (Gráfico 2 e 3) A expressão do receptor *FGFR2* ( $p=0,002$ ) foi menor em pacientes do grupo controle. (Gráfico 4).

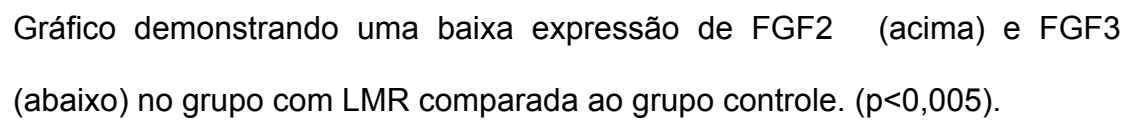
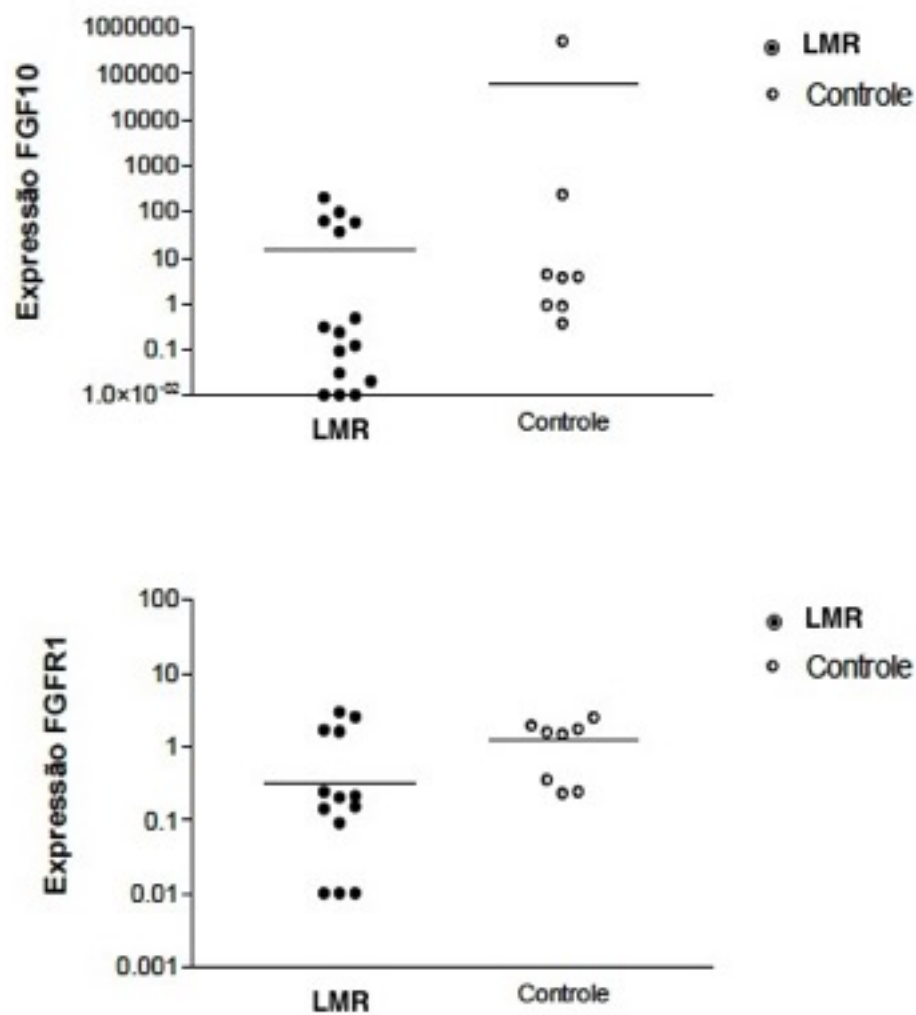


Gráfico 3: Resultados da expressão do RNAm dos genes FGF10 e FGFR1.



Gráficos demonstrando uma menor expressão de FGF10 (acima) e FGFR1 (abaixo) no grupo com LMR comparada ao grupo controle.

Gráfico 4: Resultados da expressão do RNAm do gene FGFR2.

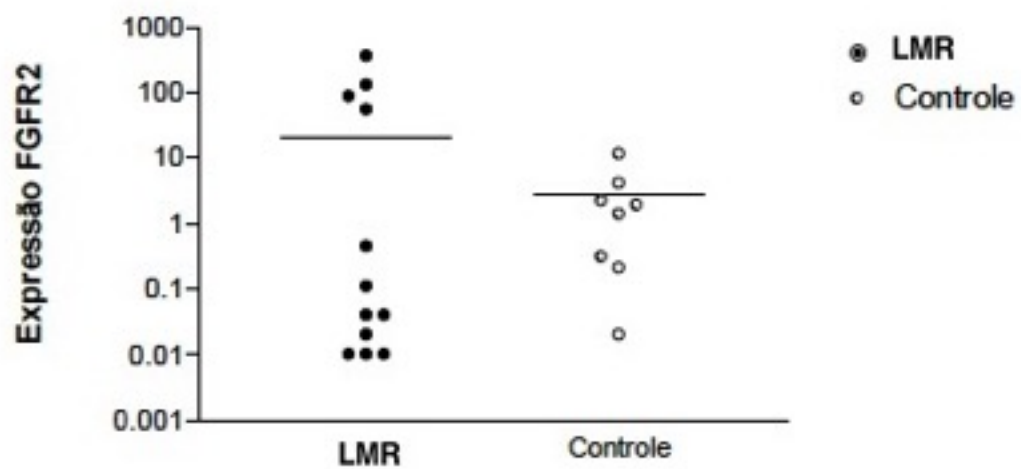


Gráfico demonstrando uma menor expressão de FGFR2 no grupo grupo controle comparados ao grupo de LMR.

## 6 DISCUSSÃO

A doença do manguito rotador é um problema clínico comum, que se caracteriza por lesão dos tendões dos músculos supraespinal, infraespinal, subescapular e redondo menor, e variam de tendinopatias a rupturas extensas dos tendões (ENSOR, 2013). Apesar da alta prevalência de rupturas completas dos tendões do manguito rotador se relacionar com a idade, há evidência de uma predisposição individual ao desenvolvimento das lesões desses tendões (YAMAGUCHI et al.,2001; CHAUDHURY e CARR, 2012; MOTTA et al., 2014). A existência de um componente individual reforça a necessidade de estudo da expressão fenotípica em tendões rotos do manguito rotador, uma vez que o espectro clínico de apresentação da doença é extremamente amplo e sua incidência crescente (ENSOR,2013; YAMAGUCHI et al.,2001; YAMAMOTO et al.,2010; MOTTA et al.,2014; HARVIE et al.,2004; TASHJIAN et al., 2009).

A patogênese das lesões do manguito rotador inclui fatores intrínsecos e extrínsecos (YAMAMOTO et al.,2010). Atualmente, se acredita que os fatores extrínsecos atuam diretamente sobre a homeostasia do tendão, sendo a associação desses fatores responsável pelo fenótipo expresso nos tendões doentes (ASPENBERG,2007; KILLIAM et al.,2012; MOUSAVIZADEH et al.,2014; LOHBERGER et al.,2015; POPOV et al.,2015). A característica tecidual frequentemente encontrado nos tendões doentes do manguito rotador são: hipovascularização, modificações da MEC, desorganização das fibras colágenas, hipocelularidade, alterações dos mecanismos de apoptose

e renovação celular (MATTHEWS et al.,2006; BENSON et al.,2010; DEL BUONO et al.,2012, BEDI et al., 2012). A história natural da doença sugere que muitas dessas modificações estruturais da unidade musculotendinosa são irreversíveis (GLADSTONE et al.,2007; PAXTON et al.,2013).

Dentre as diversas moléculas envolvidas no metabolismo dos tendões, destacam-se os *FGFs*, que foram descritos como fatores fundamentais na diferenciação embrionária dos miótomos em célula de tendão (BRENT et al., 2003; YUN et al.,2010). Há evidência de que os *FGFs* são um importante fator de crescimento envolvido nos efeitos de reparo e regeneração tecidual, promovendo proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, além de angiogênese (YUN et al, 2010; DEL BUONO et al, 2012, BEDI et al, 2012; KILLIAN et al, 2012). Os *FGFs* atuam em diversas vias de transcrição envolvidas na homeostase tecidual do tendão. (CHOO et al, 2014). Na membrana celular se ligam a um receptor específico, *FGFR*, desencadeando diferentes cascatas de eventos intracelulares, que terminam por promover alterações na expressão de proteínas envolvidas na homeostasia dos tendões (YUN et al.,2010). Nosso estudo confirmou a relevância do estudo da expressão dos *FGFs* em tendões, onde nossos resultados demonstraram uma diminuição na expressão de *FGF2*, *FGF3*, *FGF10* e *FGFR1* no grupo de tendões supraespinais rotos em comparação com os tendões semitendinosos saudáveis. Esses resultados são compatíveis com o baixo potencial biológico cicatricial das lesões do manguito rotador descrito na literatura, em que há evidências de que a baixa concentração de fatores moleculares relacionados a síntese de cicatriz tecidual é uma característica intrínseca desses tendões, e que isso se relaciona com a cronicidade e extensão da lesão (TAKAHASHI

et al.,2002; FREY et al.,2009, SCHMULTZ et al.,2009; BEDI et al.,2012; KILLIAM et al.,2013; LIU et al.,2012; LOHBERGER et al.,2015).

Um dos principais problemas nos estudos clínicos da doença do manguito rotador é a dificuldade em estabelecer um grupo de estudo homogêneo a fim de evitar viés na interpretação dos resultados, pois trata-se de doença de alta prevalência na população, mas com características clínicas diversas (MCELVANY et al, 2015). Acreditamos que nossos critérios de inclusão no grupo de estudo (LMR) foram ideais, uma vez que estudamos uma amostra de pacientes com características clínicas homogêneas. Ao estudarmos pacientes com lesões atraumáticas, crônicas, do tendão supraespinal, de ambos os sexos, com faixa etária característica da doença, conseguimos uma amostra representativa de um espectro específico extremamente frequente da doença do manguito rotador. Os trabalhos publicados referentes a esse tema apresentam seleção de pacientes heterogênea, o que acreditamos dificultar a interpretação dos achados (FREY et al.,2009; SCHMULTZ et al.,2009; YAMAMOTO et al.,2010; ENSOR et al., 2013; PAXTON et al., 2013; MCELVANY et al., 2015)

O grupo controle foi constituído por indivíduos submetidos a reconstrução do ligamento cruzado anterior com autoenxerto de tendão semitendinoso pelo CCJ do INTO. As principais críticas em relação a constituição do grupo controle de nosso estudo se baseiam nas idéias de que esses pacientes são mais jovens em relação ao grupo de estudo, que não foram submetidos a exame de imagem do ombro para avaliação de doença assintomática do manguito rotador, além de estarmos comparando tendões com características anatômicas distintas. Contudo, acreditamos que o grupo

controle que utilizamos nesse estudo foi adequado, pois permitiu alcançar o objetivo de comparar o grupo de estudo (LMR) com um grupo de pacientes com tendões saudáveis, sendo assim, possível demonstrar que tendões saudáveis apresentam fenótipo dos FGFs diferente dos tendões rotos. Estudos semelhantes ao nosso, utilizaram grupos controles de característica diversas que acreditamos causar um importante limitação a interpretação dos resultados (LO et al.,2004; MATTHEWS et al.,2006; MILLAR et al.,2009; SCHMULTZ et al.,2009; BENSON et al.,2010; BEDI et al.,2010; LAKEMEIER et al.,2010; LUNDGREEN et al.,2011; SHINDLE et al.,2011; SHIRACHI et al., 2011)

Em relação a diferença de idade entre os grupos avaliados, acreditamos, que há um componente genético documentado na literatura, que justifica uma predisposição individual ao desenvolvimento da doença do manguito rotador (HARVIE et al.,2004; TASHJIAN et al.,2009; MOTTA et al., 2014), e que comparar grupos com diferenças de idade não desqualifica nossa amostra, pois caso os indivíduos componentes do grupo com idade mais jovem apresentassem predisposição individual ao desenvolvimento da doença do manguito rotador, era de se esperar que apresentassem, ao menos, história clínica de tendinopatias, porém, esse indivíduos não apresentavam história de dor no ombro, nem exame clínico característico da doença, o que dispensa a necessidade da realização de exame de imagem nos ombros desses pacientes (YAMAGUCHI et al.,2001; KEENER et al., 2015).

Vale ressaltar que é frequente a identificação de alterações intrasubstanciais em tendões nos exames de imagem de RM de pacientes

jovens, com doença sintomática do manguito rotador (WEINERB et al.,2014). Logo, o fato do grupo controle ser constituído de indivíduos com ombros assintomáticos nos garante uma confiabilidade alta de que comparamos indivíduos com tendões saudáveis do joelho com doentes do manguito rotador. Além disso, esses pacientes do grupo controle foram submetidos a cirurgia de reconstrução do ligamento cruzado anterior utilizando autoenxerto do tendão semitendinoso, ratificando a ideia de que tratavam-se de tendões saudáveis.

Por fim, evitamos utilizar amostras de tendões íntegros de ombros que apresentavam lesão do tendão supraespinal como em outros estudos, como subescapular e infraespinal, ou de tendões íntegros do manguito rotador com doença articular degenerativa que seriam submetidos a artroplastia, pois entendemos que pela características anatômicas da inserção dos tendões manguito rotador no úmero, e pela característica de progressão natural da lesão do manguito rotador, os tendões mesmo íntegros em sua forma, apresentam degeneração. Sugerindo a existência de um acometimento global dos diferentes tecidos articulares, o que proporciona um viés de interpretação dos resultados, uma vez que mesmo íntegros, não os consideramos saudáveis (JOSEPH et al., 2009; MILLAR et al.,2009; SHINDLE et al., 2009; TASHJIAN et al.,2009; CHOO et al.,2014).

As pesquisas em tendões pode ser conduzida em nível histológico ou molecular (SEJERSEN et al, 2015). Em nossa metodologia realizamos um estudo de transcrição, em que limitamos nossa pesquisa a expressão de *FGFs* em tendões supraespinais lesionados. Essa metodologia tem sido realizada de forma consistente em outras publicações (CHANG et al.,1998;

GLADSTONE et al.,2007; FREY et al.,2009; SCHMULTZ et al.,2009; LIU et al.,2012; CAI et al.,2013; PAXTON et al.,2013; CHOO et al.,2014). Apesar dessa forma de estudo restringir os resultados a apenas um grupo de moléculas envolvidas no metabolismo dos tendões, acreditamos ser essa uma forma adequada de compreender melhor as alterações biológicas envolvidas em pacientes com lesão crônica do tendão supraespinal. O enfoque único na transcrição dos *FGFs*, em um grupo homogêneo de pacientes, aumenta a consistência dos resultados, e auxilia na compreensão das alterações moleculares que ocorrem no ambiente tecidual de tendões rotos. Compreender o caráter multifatorial da doença dos tendões do manguito rotador baseado na complexidade do ambiente molecular tecidual e na influência do componente mecânico na sua fisiopatologia é fundamental na interpretação de nossos resultado (SEITZ et al., 2011; KILLIAN et al., 2012; KILLIAN et al., 2013; LOHBERGER et al., 2015; MCELVANY et al., 2015; POPOV et al., 2015; SEJERSEN et al., 2015).

Nosso estudo utilizou amostras de RNA obtido de células tendinosas do manguito rotador roto de pacientes submetidos a reparo cirúrgico por técnica aberta, a partir de um fragmento suficiente da borda do tendão. Após a confirmação da integridade e pureza do RNA obtido, foi sintetizado DNA complementar (cDNA) e a partir daí, foi executada a reação de PCR quantitativo para amplificar a amostra para análise. Então, o fenótipo dos tenócitos foi realizado com marcadores genéticos. Uma vez confirmados os tenócitos foi possível avaliar iniciadores específicos para os genes *FGF2*, *FGF3*, *FGF10*, *FGFR1* e *FGFR2* com base nos dados do BLAST. Essa sequência de procedimentos permitiu obtermos uma análise adequada dos

resultados, demonstrando alterações nas expressões gênicas dos *FGFs* em tendões rotos do manguito rotador. Nosso resultado confirmou que o tecido celular isolado era de tenócitos através da expressão gênica de proteínas de membrana, de acordo com o que foi descrito na literatura (WANG et al., 2005; DOCHEVA et al., 2005; BI et al., 2007; KLATTE et al., 2010; BUSTIN et al., 2009). Cerca de 88% das amostras tiveram expressões detectáveis do RNAm no grupo de estudo (LMR), garantindo que se tratava de uma amostra significativa.

Além disso, conseguimos identificar uma menor expressão de *FGF2* ( $p=0,001$ ), *FGF3* ( $p=0,002$ ), *FGF10* ( $p=0,001$ ) e *FGFR1* ( $p=0,0007$ ) no grupo de estudo (LMR), porém existia uma baixa expressão de *FGFR2* no controle ( $p=0,002$ ). A identificação de uma menor expressão de citocinas que estimulam a proliferação, diferenciação e migração celular encontra-se de acordo com a literatura. (LONGO et al., 2008; FREY et al., 2009; SCHMULTZ et al., 2009; CHAUDHURY E CARR, 2012; DEL BUONO et al., 2012; BEDI et al., 2012; CHOO et al., 2014) Nossos achados de uma diminuição da expressão de *FGFs* em cotos de tendões do supraespinal rotos, justificam as evidências de que as lesões crônicas dos tendões do manguito rotador apresentam alterações estruturais como: hipocelularidade, hipovascularização, degeneração muscular gordurosa e baixo potencial de cicatrização (GLADSTONE et al., 2007; PAXTON et al., 2013).

Em pacientes com lesões pequenas e iniciais do manguito rotador, os músculos aparentemente preservam a capacidade regenerativa, com aumento da expressão de genes relacionados a proliferação e diferenciação de células musculares (*MYOD1*, *MYF5*) (CHOO et al., 2012). Já em lesões

extensas ou crônicas, há menor expressão de genes relacionados a miogênese, sugerindo que lesões crônicas encontram-se em um estado ativo de inibição muscular (SCHMULTZ et al.,2009; CHOO et al.,2012). Quanto a família de genes relacionados a proliferação fibroblástica, em tendinopatias e lesões pequenas e agudas, há evidência de aumento da expressão gênica de fatores inflamatórios (*TGFB1*, *CTGF*) e moderadores da síntese de colágeno (*COL1A1*, *COL3A1*, *TIMP1*, *TIMP3*), enquanto que em lesões extensas e crônicas existe menor expressão desses marcadores (CHOO et al.,2012). Esses achados prévios estão de acordo com nossos resultados, onde há uma menor expressão de *FGFs* relacionados a síntese de MEC em tendões com ruptura crônica do manguito rotador.

Dentre nosso achados destacamos a menor expressão de *FGF2* nos tendões de pacientes com lesão crônica do tendão supraespinal. O *FGF2* é mediador da transdução da sinalização celular através da ligação com os receptores dos fatores de crescimento tirosina-quinase (*FGFRs*) existentes nas membranas celulares, ativando moléculas de sinalização citoplasmáticas, como *PI3K-Akt* e *MAPK* (YUN et al.,2010; CAI et al.,2013). Dessa forma, o *FGF2* estimula o crescimento e diferenciação de células mesenquimais pluripotenciais, induzindo a motilidade celular por aumento na expressão de proteínas vimentina e alfa-actina de músculo liso (*SMA*) (CAI et al.,2013). Além disso, o *FGF2* demonstrou estimular a diferenciação condrogênica e adipogênica em células mesenquimais (SOLCHAGA et al.,2005). A via *MAPK* aparenta ser capaz de induzir a diferenciação de células mesenquimais em tendões por ação do *FGF2* (CAI et al.,2013). Essa função é realizada através do estímulo a produção de proteínas constituintes da MEC dos tendões como

colágeno tipo I e III e esclerose (CAI et al.,2013). Além disso, há evidência de que a sinalização intracelular pela fosforilação de *ERK1/2* em células mesenquimais é ativada pelo aumento na expressão de *FGF2*, promovendo mitogênese, e que uma menor concentração de *FGF2* no meio, diminui essa função (OZAKI et al.,2005). Dessa forma, nosso resultado, sugere que a menor capacidade regenerativa e cicatricial dos tendões do manguito rotador que apresentam rupturas crônicas pode estar associada a menor expressão de *FGF2* nesses tendões. Além disso, alterações na expressão de receptores *FGFR* podem caracterizar um estado de inibição crônico no metabolismo do tendão que justificaria uma resposta ineficiente de tendões com rupturas crônicas mesmo após o uso de terapias com fatores de crescimento tecidual.

Nossos achados necessitam ser extrapolados para as condições clínicas em que o cirurgião ortopédico se defronta. Estratégias no tratamento das tendinopatias e na cicatrização pós-operatória dos tendões são importantes temas de debate na literatura (KILLIAN et al.,2012). Alguns estudos vem sugerindo que estímulos mecânicos aumentam a expressão de proteínas da MEC em tendões (KILLIAN et al.,2012; LOHBERGER et al., 2015; POPOV et al.,2015). Essa associação entre fatores extrínsecos, estímulo mecânico, e intrínsecos, alterações na síntese e expressão de proteínas envolvidas na homeostase do tecido músculo-tendinoso, se chama mecanobiologia. Desse mecanismo, destaca-se o aumento da síntese de esclerose, que é fator fundamental a tenogênese, e de fator transformador de crescimento- $\beta$  (*TGF- $\beta$* ) após estímulos mecânicos (KILLIAM et al.,2012; LOHBERGER et al.,2015; POPOV et al.,2015). Durante o desenvolvimento embrionário do tendão, o estímulo mecânico é necessário para o

desenvolvimento da microestrutura e resistência tecidual, através da síntese de esclerose e tenascina (BRENT et al.,2003; KILLIAM et al.,2012; THOMOPOULOS et al.,2011).

Além disso, a imobilidade propicia redução da maturação e aumento do acúmulo de gordura nos músculos. A ausência completa de tensão sobre a JOT diminui o potencial de formação de MEC (GALATZ et al.,2009). Por outro lado, períodos de imobilização parecem ser fundamentais na prevenção das re-rupturas pós-cirúrgicas em tendões do manguito rotador, melhorando as propriedades viscoelásticas e aumentando a organização das fibras colágenas, quando comparadas a tendões expostos a mobilização precoce (KILLIAM et al.,2012; PARSON et al.,2010; THOMOPOULOS et al.,2003). Sendo assim, admitindo que o tendão é um tecido mecanosensitivo, pode-se afirmar que o estímulo mecânico é um dos reguladores do seu metabolismo (LOHBERGER et al.,2015; POPOV et al.,2015; KILLIAM et al.,2012). Aparentemente, diferentes tendões, apresentam diferentes respostas a estímulos mecânicos, e períodos de repouso são importantes na síntese de colágeno I e III, decorina e tenascina (LOHBERGER et al.,2015). Investigar a expressão de *FGFs* após estímulos mecânicos pode contribuir para um melhor entendimento do mecanismo de regeneração e cicatrização dos tendões, e pode melhorar o potencial do tratamento não cirúrgico das tendinopatias e a cicatrização do tendão submetidos a reconstruções cirúrgicas.

Entendemos como perspectivas futuras tentar identificar padrões de expressões dos *FGFs* em diferentes estágios evolutivos da doença do manguito rotador, porém esse modelo de estudo se mostra um desafio em

virtude das características heterogêneas desses pacientes. Nossos achados nos permitem especular que tendões do manguito rotador com doença crônica têm menor capacidade de sintetizar moléculas que estimulem a homeostasia da MEC e consequentemente, têm menor capacidade de formar cicatriz. Nossa amostra de estudo (LMR) se resumiu a lesões completas e crônicas do manguito rotador. Acreditamos que nossos resultados servirão de fundamento para estudos que ambicionem o desenvolvimento de novas terapias para tratamento das doenças dos tendões, baseado na ativação de fatores moleculares relacionados a formação e remodelamento da MEC.

## 7 Conclusão

Os tendões supraespinais de pacientes com rupturas crônicas do manguito rotador apresentam uma baixa expressão de *FGF1*, *FGF2*, *FGF3*, *FGF10* e do receptor *FGFR1* quando comparados aos tendões semitendinosos saudáveis.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN PW, LI J, FINN A, AHMED M, KREICBERGS A. Autonomic innervation of tendons, ligaments and joint capsules. A morphologic and quantitative study in the rat. *J Orthop Res* 2001;19:372-378.

ARNOCZKY SP, LAVAGNINO M, EGERBACHER M. The mechanobiological etiopathogenesis of tendinopathy: is this it the over-stimulation or the under stimulation of tendon cells ? *International Journal of experimental pathology* 2007;88:217-226.

ASPENBERG P. Stimulation of tendon repair: mechanical loading, GDFs and platelets: A mini-review. *International Orthopedics* 2007;31:783-789.

BEDI A, MAAK T, WALSH C, RODEO S.A., GRANDE D, DINES D.M., DINES J.S.. Cytokines in rotator cuff degeneration and repair. *J Shoulder Elbow Surg* 2012;21:218-227.

BENSON R.T., MCDONNELL S.M., KNOWLES H.J., REES J.L., CARR A.J., HULLEY P.A.. Tendinopathy and tears of the rotator cuff are associated with hypoxia and apoptosis. *J Bone Joint Surg Br* 2010;92:448-453.

BI, Y.; EHIRCHOU, D.; KILTS, T. M.; INKSON, C. A.; EMBREE, M. C.; SONOYAMA, W.; LI, L.; LEET, A.I.; SEO, B.M.; ZHANG, L.; SHI, S.; YOUNG, M. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nature Medicine*. 2007;13(10): 1219-1227pp.

BIRCH HL. Tendon matrix composition and turnover in relation to functional requirements. *Int Exp Pathol* 2007;88:241-248.

- BISHOP JE BUTT R., DAWES H., LAURENT G.. Mechanical load enhances the stimulatory effect of PDGD on pulmonary artery fibroblast procollagen synthesis. *Chest* 1998;114:25S.
- BOLT P, CLERK A.N., LUU H.H., ET AL. BMP-14 gene therapy increases tendon tensile strength in a rat model of Achilles tendon injury. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89(6):1315-1320.
- BRENT AE, SCHWEITZER R, TABIN CJ. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* 2003;113:235-248.
- BUSTIN S.A., BENES V, GARSON J.A., HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL M.W., SHIPLEY G.L., VANDESOMPELE J, WITTEWER C.T.. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-622.
- CAI TY, ZHU W, CHEN XS, ZHOU SY, JIA LS, SUN YQ. Fibroblastic growth factor 2 induces mesenchymal stem cells to differentiate into tenocytes through the MAPK pathway. *Mol Med Rep* 2013;8:1323-1328.
- CHAN B.P., FU S.C., QIN L, LEE K, ROLF C.G., CHAN K. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand* 2000;71:513-518.
- CHANG J. MOST D. THUNDER R., MEHRARA B., LONGAKER M.T., LINEAWEAVER W.C.. Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression. *J Hand Surg* 1998;23:1052-1058.

- CHAUDHURY S, CARR A.J.. Lessons we can learn from gene expression patterns in rotator cuff tears and tendinopathies. *J Shoulder Elbow Surg* 2012;21:191-199.
- CHOO A, MCCARTHY M, PICHIKA R, SATO EJ, LIEBER RL, SCHENK S, LANE JG, WARD S. Muscle gene expression patterns in human rotator cuff pathology. *J Bone Joint Surg Am* 2014;96:1558-1565.
- CLARKE M.S., FEEBACK D.L.. Mechanical load induces sarcoplasmic wounding and FGF release in differentiated human skeletal muscle cultures. *FASEB J* 1996;10:502-509.
- CLARK JM, HARRYMAN DT. Tendons, ligaments and capsule of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Am* 1992;74:713-725.
- COLLINS M, RALEIGH S.M.. Genetic risk factors for musculoskeletal soft tissue injuries. *Med Sport Sci* 2009;54:136-149.
- CURTIS AS, BURBANK KM, TIERNEY JJ, SCHELLER AD, CURRAN AR. The insertion footprint of the rotator cuff: an anatomic study. *Arthroscopy* 2006;22:609e1.
- DOCHEVA, D.; HUNZIKER, E.B.; FASSLER, R.; BRANDAU, O. Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. *Molecular and Cellular Biology*. 2005;25(2):699-705pp.
- DEL BUONO A.D, OLIVA F, LONGO U.G., RODEO S.A, ORCHARD J, DENARO V, ET AL. Metalloproteases and rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 2012;21:200-208.
- DESAI S.. Prevention of IGF-1 and TGF- $\beta$  stimulated type II collagen and decorin expression by  $\beta$ -FGF and identification of IGF-1 mRNA transcripts in articular chondrocytes. *Matrix Biol* 2001;20:233-242.

- DOBLE B.W., KARDAMI E. Basic fibroblast growth factor stimulates connexin-43 expression and intercellular communication of cardiac fibroblast. *Mol Cell Biochem* 1995;143:81-87.
- DUFFY F.J., SEILER J.G., GELBERMAN R.H., HERGRUETER C.A. Growth factors and canine flexor tendon healing: initial studies in uninjured and repair models. *J Hand Surg* 1995;20:645-649.
- ENSOR KL, KWON YW, DIBENEDITTO MR, ZUCKERMAN JD, ROKITO AS. The rising incidence of rotator cuff repairs. *J Shoulder Elbow Surg* 2013;22:1628-1632.
- ESWARAKUMAR V.P., LAX I., SCHLESSINGER J.. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2005;16(2):139-149.
- EVANS C.H., GHIVIZZANI S.C., HERDON J.H., ROBBINS P.D.. Gene therapy for the treatment of musculoskeletal diseases. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13:230-242.
- FREY E, REGENFELDER F, SUSSMANN P, ZUMSTEIN M, GERBER C, BORN W, FUCHS B. Adipogenic and myogenic gene expression in rotator cuff muscle of the sheep after tendon tear. *J Orthop Res* 2009;27:504-509.
- FYFE I, STANISH WD. The use of eccentric training and stretching in the treatment and prevention of tendon injuries. *Clin Sports Med* 1992;11:601-624.
- GALATZ LM, CHARLTON N, DAS R, KIM HM, HAVLIOGLU N, THOMOPOULOS S. Complete removal of load is detrimental to rotator cuff healing. *J Shoulder Elbow Surg* 2009;18:669-675.

- GAROFALO R, CESARI E, VINCI E, CASTAGNA A. Role of metalloproteinases in rotator cuff tear. *Sports Med Arthrosc* 2011;19:207-212.
- GLADSTONE JN BISHOP JY, LO IK, FLATOW EL. Fatty infiltration and atrophy of the rotator cuff do not improve after rotator cuff repair and correlate with poor functional outcome. *Am J Sports Med* 2007;35:719-728.
- GOETZ, R.; MOHAMMADI, M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013;14:166-180.
- HAMILTON J.A., BUTLER D.M., STANTON H.. Cytokines interactions promote DNA synthesis in human synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 1994;21:797-803.
- HARVIE P, OSTLERE S.J., TEH J, et al. Genetics influences in the aetiology of tears of the rotator cuff. Sibling risk of a full-thickness tear. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86:696-700.
- HARWOOD R., GRANT M.E., JACKSON D.S. The route of secretion of pro collagen. *Biochem J* 1976;156:81-90.
- HOGAN M.V., BAGAYOKO N, JAMES R, STARNES T, KATZ A, CHHABRA A.B.. Tissue engineering solutions for tendon repair. *J Am Acad Orthop Surg* 2011;19:131-142.
- ITOH N. The FGF families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism and disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2007;30(10):1819-1825.

- JAYE M, SCHLESSINGER J., DIONNE C.A.. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1992;1135(2):185-199.
- JOSEPH M, MARESH CM, MCCARTHY MB, KRAEMER WJ, LEDGARD F, ARCIERO CL. ANDERSON JM, NINDL BC, MAZZOCCA AD. Histological and molecular analysis of the biceps tendon long head post-tenotomy. *J Orthop Res* 2009;27:1379-1385.
- JOZSA L, KANNUS P, BALINT JB, REFFY A. Three dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat (Basel)* 1991;142:306-312.
- KAHN KM, COOK JL, BONAR F, HARCOURT P, ASTROM M. Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. *Sports Med* 1999;27:393-408.
- KANNUS P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 2000;10:312-320.
- KANNUS P, JOZSA L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:1507-1525.
- KANNUS P, JOZSA L, NUTRI A, JARVINEN M. Effects of training, mobilization and remobilization on tendons. *Scand J Med Sci Sports* 1997;7:67-71.
- KATOH M, KATOH M. FGF signaling network in the gastrointestinal tract (review), *International journal of oncology* 2006;29(1):163-168.

- KEENER JD, GALATZ LM, TEEFEY SA, MIDDLETON WD, STEGER-MAY K, STOBBS-CUCCHI G, PATTON R, YAMAGUCHI K. A prospective evaluation of survivorship of asymptomatic degenerative rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am* 2015;97:89-98.
- KELLER T.C., HOGAN M.V., KESTURU G, JAMES R, BALIAN G, CHHABRA A: Growth and differentiation factor-5 modulates the synthesis and expression of extracellular matrix and adhesion-related molecules of rat Achilles tendon fibroblasts.. *Connect Tissue Res* 2011;52(4):543-551.
- KER R.F.. The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function. *Comp Biochem Physiol a Mol Integr Physiol* 2002;133:987-1000.
- KILLIAN ML, CAVINATTO L, GALATZ LM, THOMOPOULOS S. The role of mechanobiology in tendon healing. *J Shoulder Elbow Surg* 2012;21:228-237.
- KILLIAN ML, LIM CT, THOMOPOULOS S, CHARLTON N, KIM HM, GALATZ L. The effect of unloading on gene expression of healthy and injured rotator cuffs. *J Orthop Res* 2013;31:1240-1248.
- KLATTE, S. P. F.; STROBEL, C.; SCHMIDMAIER, G.; GREINER, S.; SCHEIBEL, M.; WILDEMANN, B. Characterization of tendon cell cultures of the human rotator cuff. *European Cells and Materials*. 2010;20:84–97pp.
- LAKEMEIER S, REICHTE JJ, PATZER T, FUCHS WILKELMAM S, PALETTA JR, SCHOFER MD. The relevance of long head biceps degeneration in the presence of rotator cuff tears. *BMC Musculoskelet Disord* 2010;11:191.

- LEPHART SM, PINCIVERO DM, GIRALDO JL, FU FH. The role of proprioception in the management and rehabilitation of athletic injuries. *Am J Sports Med* 1997;25:130-137.
- LEWIS JS, RAZA SA, PILCHER J, HERON C, POLONIECKI JD. The prevalence of neovascularity in patients clinically diagnosed with rotator cuff tendinopathy. *BMC Musculoskelet Disord* 2009;10:163.
- LIU X, JOSHI SK, SAMAGH SP, DANG YX, LARON D, LOVETT DH, BODINE SC, KIM HT, FEELEY BT. Evaluation of Akt/mTOR activity in muscle atrophy after rotator cuff tears in a rat model. *J Orthop Res* 2012;30:1440-1446.
- LO IK, Marchuk LL, Hollinshead R, Hart DA, Frank CB. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases mRNA levels are specifically altered in torn rotator cuff tendons. *Am J Sports Med* 2004;32:1223-1229.
- LOHBERGER B, KALTENEGGER H, STUENDI N, RINNER B, LEITHNER A, SADOGLI P. Impact of cyclic mechanical stimulation on the expression of extracellular matrix proteins in human primary rotator cuff fibroblast. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2015;21 pub ahead to print.
- LONGO U.G., FRANCESCHI F, RUZZINI L, RABITTI C, MORINI S, MAFFULLI N, et al. Histopathology of supraspinatus tendon in rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 2008;36:533-538.
- MAGANARIS CN, NARICI MV, REEVES ND. In vivo human tendon mechanical properties: effect of resistance training in old age. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004;4:204-208.

- MAGANARIS CN, REEVES ND, RITTWEGER J, SARGEANT AJ, JONES DA, GERRITS K, DEHAAN A. Adaptative response of human tendon to paralysis. *Muscle Nerve* 2006;33:85-92.
- MATSEN III FA, ARNTZ CT, LIPPITT SB. ROTATOR CUFF. IN: ROCKWOOD C, MATSEN III FA. 4th ed. The shoulder. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 2009;771-890.
- MATTHEWS T.J.W., HAND G.C., REES J.L., ATHANASOU N.A., CARR A.J.. Pathology of the torn rotator cuff tendon. Reduction in potential for repair as tear size increases. *J Bone Joint Surg Br* 2006;89:489-495.
- MCELVANY MD, MCGOLDRICK E, GEE AO, NERADILEK MB, MATSEN FA 3RD. Rotator cuff repair: published evidence on factors associated with repair integrity and clinical outcome. *Am J Sports Med* 2015;43:491-500.
- MEHR D, PARDUBSKY PD, MARTIN JA, BUCKWALTER JA. Tenascina-C in tendon regions subject to compression. *J Orthop Res* 2000;18:537-545.
- MILGRAM C, SHAFFER M, GILBERT S, VAN HOLSBEECK M. Rotator cuff changes in asynmptomatic adults. The effect of age, hand dominance and gender. *J Bone Joint Surg Br* 1995;77:296-298.
- MILLAR NL, WEI AQ, MOLLOY TJ, BONAR F, MURIEL GA. Cytocines and apoptosis in supraspinatus tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am* 2009;91:417-424.
- MOKONE G.G., GAJJAR M, SEPTEMBER A.V., et al. The guanine-thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C gene is associated with Achilles tendon injuries. *Am J Sports Med* 2005;33:1016-1021.

- MOKONE G.G., SCHWELLNUS M.P., NOAKES T.D., et al. The COL5A1 gene and Achilles tendon pathology. *Scand J Med Sci Sports* 2006;16:19-26.
- MOLLOY T, WANG Y, MURREL G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med* 2003;33:381-394.
- MOTTA G.R., AMARAL M.V., REZENDE E, PITTA R, VIEIRA T.C.S., DUARTE M.E.L., VIEIRA A.R., CASADO P.L.. Evidence of genetic variations associated with rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 2014;23:227-235.
- MOUSAVIZADEH R, KHOSRAVI S, BEHZAD H, MCCORMACK RG, DURONIO V, SCOTT A. Cyclic strain alters the expression and release of angiogenic factors by human tendon cells. *PLoS One* 2014;e97356.
- OAKES BW. Tissue healing and repair tendons and ligaments. In: Frontera WR (ed) *Rehabilitation of Sports Injuries: Scientific Basis*. Blackwell Science, Oxford,UK;2003:56-98.
- O'BRIEN M. Functional anatomy and physiology of tendons. *Colin Sports Med* 1992;11:505-520.
- OZAKI K, MIYAZAKI S, TANIMURA S, KOHNO M. Efficient supression of FGF-2 induced ERK activation by the cooperative interaction among mammalian Sprouty isoforms. *J Cell Sci* 2005;118:5861-5871.
- PARSON BO, GRUSON KI, CHEN DD, HARRINSON AK, GLADSTONE J, FLATOW EL. Does slower rehabilitation after arthroscopic rotator cuff repair leads to long-term stiffness ? *J Shoulder Elboe Surg* 2010;19:1034-1039.

- PAXTON ES, TEEFEY SA, DAHIYA N, KEENER JD, YAMAGUCHI K, GALATZ LM. Clinical and radiographic outcomes of failed repairs of large or massive rotator cuff tears. Minimum ten year follow-up. J Bone Joint Surg Am 2013;95:627-632.
- POPOV C, BURGGRAF M, KREJA L, IGNATIUS A, SCHIEKER M, DOCHEVA. Mechanical stimulation of human tendon stem/progenitor cells results in upregulation of matrix proteins, integrins and MMPs, and activation of p38 and ERK1/2 kinases. BMC Mol Biol 2015;16:6.
- REEVES ND, NARICI MV, MAGANARIS CN. Strenght training alters the viscoelastic properties of tendons in elderly humans. Muscle Nerve 2003;28:74-81.
- RILEY GP, CURRY V, DEGROOT J, VAN EL B, VERZIJL N, HAZLEMAN BL, BANK RA. Matrix metalloproteinase activies and their relationship with collagen remodeling in tendon pathology. Matrix Biol 2002;21:185-195.
- RILEY GP, HARRALL RL, CONSTANT CR, et al. Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. Ann Rheum Dis 1994;53:367-376.
- SASAKI N, SHUKUNAMI N, MATSUSHIMA N, IZUMI Y. Time-resolved X-ray diffraction from tendon colagen during creep using synchrotron radiation. J Biomech 1999;32:285-292.
- SCHLESSINGER J.. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 2000;103(2):211-225.
- SCHMULTZ S, FUCHS T, REGENFELDER F, STEINMANN P, ZUMSTEIN M,FUCHS B. Expression of atrophy mRNA relates to tendon tear size in supraspinatus muscle. Clin Orthop Rel Res 2009;467:457-464.

- SEEHHERMAN H.J., ARCHAMBAULT J.M., RODEO S.A., et al. rhBMP-12 accelerates healing of rotator cuff repairs in a sheep model. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90(10):2206-2219.
- SEITZ AL, MCCLURE PW, FINUCANE S, BOARDMAN ND 3RD, Michener LA. Mechanisms of rotator cuff tendinopathy: intrinsic, extrinsic or both ? *Clinical Biomechanics* 2011;26:1-12.
- SEJERSEN MHJ, FROST P, HANSEN TB, DEUTCH R, SVENDSEN SW. Proteomics perspectives in rotator cuff research: A systematic review of gene expression and protein composition in human tendinopathy. *PLoS One* 2015;10:e119974
- SELVANETTI A, CIPOLLA M, PUDDU G. Overuse tendon injuries: basic science and classification. *Oper Tech Sports Med* 1997;5:110-117.
- SEPTEMBER A.V., SCHWELLNUS M.P., COLLINS M. Tendon and ligament injuries: The genetic component. *Br J Sports Med* 2007;41:241-246.
- SHARMA P, MAFFULI N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:187-2002.
- SHARMA P, MAFFULLI N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6:181-190.
- SHINDLE MK, CHEN CCT, ROBERTSON C, DITULLIO AE, PAULUS MC, CLINTON CM, CORDASCO FA, RODEO SA, WARREN RF. Full-Thickness supraspinatus tears are associated with more synovial inflammation and tissue degeneration than partial-thickness tears. *J Shoulder Elbow Surg* 2009;20:917-927.
- SHIRACHI I, Gotoh M, Mitsui Y, Yamada T, Nakama K, Okawa T, Higuchi F, Nagata K. *Arthroscopy* 2011;27:1173-1179.

- SOLCHAGA LA, PENICK K, PORTER JD, GOLDBERG VM, CAPLAN AI, WELTER JF. FGF2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2005;203:398-409.
- TAKAHASHI S, NAKAJIMA M, KOBAYASHI M, WAKABAYASHI I, MIYAKOSHI N, MINAGAWA H, et al. Effect of recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) on fibroblast-like cells from human rotator cuff tendon. *Tohoku J Exp Med* 2002;198:207-214.
- TANG J.B., CAO Y, ZHU B, XIN K.Q., WANG X.T., LIU P.Y.. Adeno-associated virus-2-mediated bFGF gene transfer to digital flexor tendons significantly increases healing strength. an in vivo study. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90:1078-1089.
- TASHJIAN R.Z., FARNHAM J.M., ALBRIGHT F.S., TEERLINK C.C., CANNON-ALBRIGHT L.S.. Evidence for an inherited predisposition contributing to the risk for rotator cuff disease. *J Bone Joint Surg Am* 2009;91:1136-1142. Tillman LJ, Chasan NP. Properties of dense connective tissue and wound healing. In: Hertling D, Kessler RM (eds) *Management of Common Musculoskeletal Disorders*. Lippincott, Philadelphia, USA;1996:8-21.
- THOMOPOULOS S, DAS R, BIRMAN V, SMITH L, LU K, ELSON E, PRYSE KM, MARQUEZ JP, GENIN GM. Fibrocartilage tissue engineering: the role of the stress environment on cell morphology and matrix expression. *Tissue Eng Part A* 2011;17:1039-1053.
- THOMOPOULOS S, WILLIAMS GR, SOSLOWSKY LJ. Tendon to bone healing: differences in biomechanical, structural, and compositional

properties due to a range of activity levels. Journal of Biomechanics Engineering 2003;125:106-113.

TILLMAN LJ, CHASAN NP. Properties of dense connective tissue and wound healing. In: Hertling D, Kessler RM (eds) Management of common musculoskeletal disorders. Lippincott, Philadelphia, USA;1996:8-21.

TURNER N., GROSE R.. Fibroblast growth factor signaling: from development to cancer. Nature Reviews Cancer 2010;10(2):116-129.

YAMAGUCHI K, TETRO M, BLAM O, EVANOFF BA, TEEFEY SA, MIDDLETON WD. Natural history of asymptomatic rotator cuff tears: A longitudinal analysis of asymptomatic tears detected sonographically. J Shoulder Elbow 2001;10:199-203.

YAMAMOTO A, TAKAGISHI K, OSAWA T, YANAGAWA T, NAKAJIMA D, SHITARA H, et al. Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population. J Shoulder Elbow Surg 2010;19:116-120.

YUN Y.R., WON J.E., JEON E, LEE S, KANG W, JO H, et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. J Tissue Eng 2010;2010:218142.

WANG, Q.W.; CHEN, Z.L.; PIAO, Y.J. Mesenchymal stem cells differentiate into tenocytes by bone morphogenetic protein (BMP) 12 gene transfer. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2005a;4:418 – 422pp.

WEINREB JH, SHETH C, APOSTOLAKOS J, MCCARTHY MB, BARDEN B, COTE MP, MAZZOCCA AD. Tendon structure, disease and imaging. Muscle, Ligaments and Tendons Journal 2014;4:66-73.

## 9 ANEXOS

ANEXO I Carta de aprovação do projeto de pesquisa pela comissão de ética do INTO.



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

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da correlação entre polimorfismo genético em genes do metabolismo músculo-esquelético e lesão do manguito rotador em pacientes brasileiros”, CAAE nº. 0024.0.305.000-11, desenvolvido sob a responsabilidade de **Priscila Ladeira Casado**, está de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, tendo sido APROVADO em 26/07/2011 na reunião do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO).

O Pesquisador está autorizado a dar início à pesquisa em pauta, devendo atender às seguintes exigências:

- Encaminhar a este CEP, relatório descritivo de seu andamento ao final de cada semestre;
- Ao término da pesquisa, apresentar cópia do trabalho concluído, no formato impresso e em mídia, conforme metodologia exigida pela Instituição.

Rio de Janeiro, 27 de julho de 2011.

  
Dr. Sérgio Eduardo Vianna  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do INTO

João Antonio Matheus Guimarães  
Diretor Geral - Substituto  
Matrícula: 885233-5  
DIREG / INTO / MS

## Anexo II FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO.

**INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATO-ORTOPEDIA  
GRUPO DE CIRURGIA DO OMBRO E COTOVELO  
PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE PACIENTES**
**OMBRO – MANGUITO**

Data Preenchimento: (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) Médico Responsável pelo preenchimento: \_\_\_\_\_  
(Assinatura e Carimbo)

Prontuário: \_\_\_\_\_ Nome: \_\_\_\_\_

DN: (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) Idade: \_\_\_ Sexo: \_\_\_

End: \_\_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Afastamento INSS? (S) (N) Δt: \_\_\_\_\_

Esportes / Lazer: \_\_\_\_\_ Membro superior dominante: (D) (E)

Lado acometido: (D) (E) Queixa principal: ☐ Dor ☐ ↓ Força ☐ Outro \_\_\_\_\_ Tabagismo: (S) (N) \_\_\_\_\_

Início dos sintomas: \_\_\_\_\_ Trauma: (S) (N) Mecanismo: \_\_\_\_\_

Tratamento prévio: Fisioterapia (S) (N) Quant: \_\_\_\_\_ Tipo: \_\_\_\_\_

Infiltração (S) (N) Quant: \_\_\_\_\_ Outros: \_\_\_\_\_

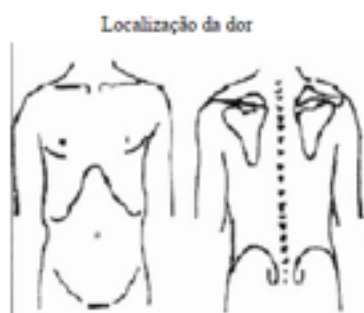
Cirurgia prévia (S) (N) Data: (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_): \_\_\_\_\_ Complicações: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_



Analgésicos: (S) (N): \_\_\_\_\_ Dor noturna: (S) (N)

Dor diurna: (S) (N) Dor atividades: (S) (N): \_\_\_\_\_



|         |               |  |
|---------|---------------|--|
| Impacto | Neer          |  |
|         | Hawkins       |  |
|         | Yokum         |  |
|         | Arco doloroso |  |
|         | Crepitação    |  |

|      |                 |  |
|------|-----------------|--|
| TCLB | Dor goteira     |  |
|      | Speed           |  |
|      | O'Brien         |  |
|      | Yergason        |  |
|      | Hiper supinação |  |
|      | Popeye          |  |

|        |             |  |
|--------|-------------|--|
| Outros | Palpação AC |  |
|        | Cross body  |  |
|        |             |  |

| SE                    | Dor | Força |
|-----------------------|-----|-------|
| Teste SE (rot neutra) |     |       |
| Jobe (rot interna)    |     |       |
| Pseudoparalisia       |     |       |

| IE               | Dor | Força |
|------------------|-----|-------|
| Teste IE         |     |       |
| Lag rot externa  |     |       |
| Drop sign        |     |       |
| Atrofia fossa IE |     |       |

| SUB               | Dor | Força |
|-------------------|-----|-------|
| Gerber            |     |       |
| Belly-press       |     |       |
| Bear hug          |     |       |
| ↑ Rot ext passiva |     |       |

|     |         | Abd | Elev | RI | RE |
|-----|---------|-----|------|----|----|
| DIR | Ativo   |     |      |    |    |
|     | Passivo |     |      |    |    |
| ESQ | Ativo   |     |      |    |    |
|     | Passivo |     |      |    |    |

Obs: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Exames de imagem

| Exames   | Data | Local            |
|----------|------|------------------|
| RX       |      | INTO ( ) Ext ( ) |
| USG      |      | INTO ( ) Ext ( ) |
| Artro-TC |      | INTO ( ) Ext ( ) |
| RM       |      | INTO ( ) Ext ( ) |
| Artro-RM |      | INTO ( ) Ext ( ) |

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Elevação cabeça          |  |
| Eclerose tubérculo maior |  |
| Cistos tubérculo maior   |  |
| Eclerose acrómio         |  |
| Tipo acrómio (Bigliani)  |  |
| Artrose gleno-umeral     |  |
| Artrose AC               |  |

| Lesão | Parcial                             | Completa                           |
|-------|-------------------------------------|------------------------------------|
| SE    | mm Art ( ) Bursal ( ) Intra-sub ( ) | Ret: mm Dist AP: mm Delam: (S) (N) |
| IE    | mm Art ( ) Bursal ( ) Intra-sub ( ) | Ret: mm Dist AP: mm Delam: (S) (N) |
| Sub   | mm Art ( ) Bursal ( ) Intra-sub ( ) | Ret: mm Dist AP: mm Delam: (S) (N) |

|           |                |                 |
|-----------|----------------|-----------------|
| SE        | ( ) Atrofia: % | ( ) Inf gord: % |
| IE        | ( ) Atrofia: % | ( ) Inf gord: % |
| Sub       | ( ) Atrofia: % | ( ) Inf gord: % |
| Goutalier |                |                 |

|                |  |
|----------------|--|
| Lesão parcial  |  |
| Lesão completa |  |
| Subluxação     |  |
| Luxação        |  |

|                                                    |                                                                                                       |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------------------------------------|--------------|----------------------------------------------|---------|--------------------------------|----------------|-----------------|--|
| CIRURGIA ATUAL ( ____ / ____ / ____ )              |                                                                                                       |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |
| CIRURGIÃO:                                         |                                                                                                       |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |
| ( ) ARTROSCOPIA ( ) MINI-OPEN ( ) ABERTO – ACESSO: |                                                                                                       |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |
| Achatos                                            | Formato lesão: U ( ) L ( ) L inv ( ) Crescente ( ) SUB: 1/3 Sup ( ) 1/2 Sup ( ) 2/3 Sup ( ) Total ( ) |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |
|                                                    | Lesão                                                                                                 | Parcial    |                                         |              | Completa                                     |         |                                |                |                 |  |
|                                                    | SE                                                                                                    | Bursal ( ) | Articular ( )                           | Intrasub ( ) | mm                                           | Ret: mm | AP: mm                         | Delam: (S) (N) |                 |  |
|                                                    | IE                                                                                                    | Bursal ( ) | Articular ( )                           | Intrasub ( ) | mm                                           | Ret: mm | AP: mm                         | Delam: (S) (N) |                 |  |
|                                                    | SUB                                                                                                   | Bursal ( ) | Articular ( )                           | Intrasub ( ) | mm                                           | Ret: mm | AP: mm                         | Delam: (S) (N) |                 |  |
|                                                    | Qualidade tecido: ( ) boa ( ) regular ( ) ruim                                                        |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |
|                                                    | TCLB: Completa ( ) Parcial ( ) Degeneração ( ) Subluxação ( ) Luxação ( )                             |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |
|                                                    | Lesão labral: (S) (N) Local:                                                                          |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |
|                                                    | Lesão cartilagem                                                                                      |            |                                         |              | Cabeça (S) (N) Outerbridge                   |         | Glenóide (S) (N) Outerbridge   |                |                 |  |
|                                                    | OBS:                                                                                                  |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |
| Reparo                                             | Acromioplastia (S) (N)                                                                                |            | LCA: Ressec ( ) Lib ( )                 |              | Coracoplastia (S) (N)                        |         | Munford: ( ) Mini-Munford: ( ) |                |                 |  |
|                                                    | Reparo parcial ( ) total ( )                                                                          |            | Reparo com tensão:                      |              | SUB: (S) (N) (±)                             |         | SE: (S) (N) (±)                |                | IE: (S) (N) (±) |  |
|                                                    | Interval slide: Ant ( ) Post ( )                                                                      |            | Convergência de margens: ( )            |              | N° pontos tendão-tendão:                     |         |                                |                |                 |  |
|                                                    | Fixação óssea                                                                                         |            | Fileira simples: Medial ( ) Lateral ( ) |              | Fileira dupla: ( ) Sugaya ( ) Sugaya mod ( ) |         |                                |                |                 |  |
|                                                    | Âncoras mediais: n°                                                                                   |            | Tipo:                                   |              | Âncoras laterais: n°                         |         | Tipo:                          |                |                 |  |
|                                                    | Âncoras SUB: n°                                                                                       |            | Tipo:                                   |              | Trans-ósseo:                                 |         |                                |                |                 |  |
|                                                    | Tenotomia TCLB: (S) (N) Tenodese: (S) (N) Técnica:                                                    |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |
|                                                    | OBS:                                                                                                  |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |
|                                                    | Desenho                                                                                               | Lesão      |                                         |              |                                              | Reparo  |                                |                |                 |  |
|                                                    |                                                                                                       |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |
| COMPLICAÇÕES:                                      |                                                                                                       |            |                                         |              |                                              |         |                                |                |                 |  |

# ESCORES

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                  |                                                                                                           |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| UCLA PRÉ: | DOR:<br>1 - Presente todo tempo e intolerável. Medicação analgésica forte e frequente.<br>2 - Presente todo tempo, sem tolerável. Medicação analgésica forte ocasionalmente.<br>3 - Nenhuma ou pouca em repouso. Presente com atividades leves. Analgésicos comuns frequentes.<br>4 - Presente durante atividades pesadas ou específicas. Analgésicos comuns ocasionalmente.<br>5 - Dor leve e ocasional.<br>10 - Nenhuma. | FUNÇÃO:<br>1 - Menor sem função.<br>2 - Apenas atividades leves.<br>3 - Atividades leves de casa e a maioria das atividades diárias.<br>4 - Menor parte das atividades de casa, fazer compras e dirigir. Passar cabelo e se vestir, incluindo o banho.<br>5 - Apenas leve restrição. Possível de realizar atividades acima do nível do outro.<br>10 - Atividades comuns. | ELEVACÃO ATIVA:<br>5 - >150°<br>4 - 120° a 150°<br>3 - 90° a 120°<br>2 - 45° a 90°<br>1 - 30° a 45°<br>0 - < 30° | FORÇA ELEVACÃO:<br>5 - Normal<br>4 - Boa<br>3 - Regular<br>2 - Pouca<br>1 - Contração mmcc<br>0 - Nenhuma |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | SATISFAÇÃO:<br>5 - Satisfeito<br>0 - Insatisfeito                                                                |                                                                                                           |

| CONSTANT PRÉ SUBJETIVO: ____ / 35 |            |                  |                  |                        | CONSTANT PRÉ OBJETIVO: ____ / 65 |                                           |             |                                                      |  |
|-----------------------------------|------------|------------------|------------------|------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------|-------------|------------------------------------------------------|--|
| DOR                               | AVD Normal | ATIVIDADE        | FLEXÃO ANT: / 10 | ABDUÇÃO: / 10          | ROT LAT: / 10                    | ROT MED: / 10                             | FORÇA: / 25 |                                                      |  |
| Nenhuma                           | 15         | Trabalho         | 4                | Até a cintura          | 2                                | Dorso da mão até a região lateral da coxa | 0           | 1 ponto por libra sustentada em elevação de 90 graus |  |
| Leve                              | 10         | Esportes / Lazer | 4                | Até o apêndice xifóide | 4                                | Dorso da mão até a região glútea          | 2           |                                                      |  |
| Moderada                          | 5          | Sono             | 2                | Até o pescoço          | 6                                | Dorso da mão até transição lombossacral   | 4           |                                                      |  |
| Grave                             | 0          |                  |                  | Até o topo da cabeça   | 8                                | Dorso da mão até a cintura (L3)           | 6           |                                                      |  |
|                                   |            |                  |                  | Acima da cabeça        | 10                               | Dorso da mão até a 12ª vértebra           | 8           |                                                      |  |
|                                   |            |                  |                  |                        |                                  | Dorso da mão até a região interescapular  | 10          |                                                      |  |

|         |               |                 |                 |                 |                 |
|---------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| CLÍNICA | DATA          | / /             | / /             | / /             | / /             |
|         | ADM (Ativo)   | / / / /         | / / / /         | / / / /         | / / / /         |
|         | CONSTANT      | / / / / / / / / | / / / / / / / / | / / / / / / / / | / / / / / / / / |
|         | UCLA          | / / / / /       | / / / / /       | / / / / /       | / / / / /       |
|         | COMPLICAÇÕES: |                 |                 |                 |                 |
|         | OBS:          |                 |                 |                 |                 |

|         |               |                 |                 |                 |                 |
|---------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| CLÍNICA | DATA          | / /             | / /             | / /             | / /             |
|         | ADM (Ativo)   | / / / /         | / / / /         | / / / /         | / / / /         |
|         | CONSTANT      | / / / / / / / / | / / / / / / / / | / / / / / / / / | / / / / / / / / |
|         | UCLA          | / / / / /       | / / / / /       | / / / / /       | / / / / /       |
|         | COMPLICAÇÕES: |                 |                 |                 |                 |
|         | OBS:          |                 |                 |                 |                 |

|        |      |     |     |     |     |
|--------|------|-----|-----|-----|-----|
| IMAGEM | DATA | / / | / / | / / | / / |
|        | OBS  |     |     |     |     |

## Anexo III TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa "Avaliação da correlação entre polimorfismo genético em genes do metabolismo músculo-esquelético e lesão do manguito rotador em pacientes brasileiros". Você foi selecionado através da fila de espera para tratamento na lesão no manguito rotador do ombro e sua participação não é obrigatória.

A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

O objetivo deste estudo é correlacionar as características clínicas da lesão com sua característica genética.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em doar sangue para exame laboratorial e, em caso de necessidade de procedimento cirúrgico para tratamento da lesão no manguito rotador, permitir que o material que seria descartado durante a cirurgia (raspado do tendão e líquido sinovial) seja coletado e armazenado para futura análise.

Todo material coletado poderá ser utilizado como fonte para esta pesquisa podendo também ser utilizado para pesquisas futuras na Unidade de Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia.

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.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. As coletas serão numeradas e seu nome não constará em qualquer recipiente a ser armazenado.

Você receberá uma cópia deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

**Identificação do Paciente**

|            |            |                    |         |          |
|------------|------------|--------------------|---------|----------|
| Paciente   |            |                    |         |          |
| Nascimento | Identidade | Órgão<br>Expedidor | Emissão | Sexo     |
| Endereço   |            |                    | Cidade  | Telefone |

Assinatura do voluntário

Priscila Ladeira Casado / Marcus Vinicius Galvão Amaral  
Avenida Brasil 500 – Rio de Janeiro – Unidade de Pesquisa Clínica  
Tel: 2134-5179/5055

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INTO  
Documento ref. ao protocolo - CAAE 0016.0.306.000-11  
aprovado na reunião em 26/07/2011  
Visto 12/08 Folha 01/01