

EDUARDO ANTÔNIO DE FIGUEIREDO

**ALTERAÇÕES DA EXPRESSÃO DE GENES
DA MATRIZ EXTRACELULAR E DA
FAMÍLIA *TGFB* NAS LESÕES DO
MANGUITO ROTADOR.**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2019

EDUARDO ANTÔNIO DE FIGUEIREDO

**ALTERAÇÕES DA EXPRESSÃO DE GENES
DA MATRIZ EXTRACELULAR E DA
FAMÍLIA *TGFB* NAS LESÕES DO
MANGUITO ROTADOR.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Moisés Cohen

COORIENTADORES: Prof. Dr. Benno Ejnisman

Prof^ª Dr^ª Mariana Ferreira Leal

São Paulo

2019

Figueiredo, Eduardo Antônio de

**Alterações da expressão de genes da matriz extracelular e da família
TGFB nas lesões do manguito rotador.** / Eduardo Antônio de Figueiredo. --
São Paulo, 2019.
XV, 111f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-
Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Changes in the expression of matrix extracellular genes and
TGFB Family members in rotator cuff tears.

1. Manguito rotador. 2. Histologia. 3. Expressão gênica. 4. Matriz
extracelular. 5. Fator de crescimento transformador beta.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
TRANSLACIONAL**

Departamento de Ortopedia e Traumatologia

Departamento de Morfologia e Genética

Departamento de Patologia

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional:

Prof.^a Dr.^a Lydia Masako Ferreira

Departamento de Ortopedia e Traumatologia:

Prof. Dr. Moises Cohen

Departamento de Morfologia e Genética:

Prof.^a Dr.^a Marília de Arruda Cardoso Smith

Departamento de Patologia:

Prof.^a Dr.^a Maria Teresa Seixas Alves

Universidade Federal de São Paulo

Reitora: Prof.^a Dr.^a Soraya Soubhi Smaili

Vice-Reitor: Prof. Dr. Nelson Sass

Chefe de Gabinete: Prof.^a Dr.^a Andrea Rabinovici

Este estudo foi desenvolvido nas:

Disciplina de Medicina esportiva e Atividade Física – Departamento de Ortopedia e Traumatologia – Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo

Disciplina de Genética – Departamento de Morfologia e Genética – Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo

Disciplina de Anatomia Patológica – Departamento de Patologia – Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo

Auxílios Financeiros:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

- Auxílio à pesquisa (Jovem Pesquisador): número de processo 2011/22548-2.
- Beneficiária: Mariana Ferreira Leal

ORIENTADOR

Prof. Dr. Moisés Cohen

Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia
Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

COORIENTADORES

Prof. Dr. Benno Ejnisman

Professor Adjunto do Departamento de Ortopedia e Traumatologia
Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Prof.^a Dr.^a Mariana Ferreira Leal

Professora Afiliada do Departamento de Ortopedia e Traumatologia
Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

EQUIPE DE PESQUISA

Disciplina de Medicina Esportiva e Atividade Física – Departamento de Ortopedia e Traumatologia – Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo

- Prof. Dr. Moisés Cohen - Professor Titular e Chefe de Departamento
- Prof. Dr. Benno Ejnisman - Professor Adjunto e Chefe da Disciplina
- Prof.^a Dr.^a Mariana Ferreira Leal - Professora Afiliada
- Prof. Dr. Alberto de Castro Pochini - Professor Adjunto
- Prof. Dr. Carlos Vicente Andreoli - Professor Adjunto e Chefe da Residência Médica em Medicina Esportiva
- Dr. Paulo Santoro Belangero - Doutor e Chefe do Grupo de ombro e cotovelo
- Dr.^a Leonor Isabel Casilla Loyola - Doutora
- Dr.^a Carina Cohen - Doutora

Disciplina de Genética – Departamento de Morfologia e Genética – Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo

- Prof.^a Dr.^a Marília de Arruda Cardoso Smith - Professora Titular e Vice-Chefe da Disciplina

Disciplina de Anatomia Patológica – Departamento de Patologia – Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo

- Prof.^a Dr.^a Maria Teresa Seixas Alves – Professora Titular e Chefe da Disciplina

Alterações da expressão de genes da matriz extracelular e da família *TGFB* nas lesões do manguito Rotador

PRESIDENTE DA BANCA: Prof. Dr. Moisés Cohen

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alberto de Castro Pochini

Prof. Dr. Alberto Naoki Miyazaki

Prof. Dr. Mauro Emílio Conforto Gracitelli

Prof. Dr. Roberto Yukio Ikemoto

Suplentes:

Prof. Dr. Carlos Vicente Andreoli

Prof. Dr. Mário Lenza

Aprovada em: ___/___/___

DEDICATÓRIA

*À minha amada esposa, Gabriela,
que me fez entender o lado bom, o bom do amor.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, ANTONIO (*in memorian*) e CLEONICE, que nunca mediram esforços em minha formação. Exemplos de amor, retidão e carinho.

Ao Prof. Dr. MOISÉS COHEN, uma pessoa a frente de seu tempo. Essencial na elaboração do projeto e no enfrentamento das dificuldades da pós-graduação.

Ao Prof. Dr. BENNO EJNISMAN, pelo exemplo e inúmeras oportunidades de crescimento, abrindo portas desde o primeiro momento em que o encontrei, ainda durante o período da graduação. Modelo a se espelhar tanto na vida acadêmica, como na profissional e pessoal.

À Profa. Dra. MARIANA FERREIRA LEAL, pesquisadora nata. Detalhista, ética e batalhadora. Sua participação foi fundamental na obtenção dos auxílios de pesquisa, na formulação dos resultados e na elaboração dos artigos científicos.

Ao Prof. Dr. ALBERTO DE CASTRO POCHINI, exemplo de médico, educação e dedicação à ciência.

Ao Prof. Dr. CARLOS VICENTE ANDREOLI, por sua colaboração na coleta dos casos, amizade e dedicação ao CETE.

Ao Prof. Dr. PAULO SANTORO BELANGERO, grande amigo, companheiro das atividades profissionais e científicas. Por ter me introduzido ao grupo de genética, pelos conselhos profissionais e acadêmicos.

À Dra. CARINA COHEN, pelo auxílio, conselhos técnicos e ajuda nas coletas de pacientes e controles.

À Profa. Dra. MARÍLIA CARDOSO DE ARRUDA SMITH, por acreditar no projeto de nosso grupo e viabilizar sua realização.

À Profa. Dra. MARIA TERESA SEIXAS ALVES, pelo auxílio na análise dos resultados e pela paciência em ensinar as particularidades do estudo histológico.

À Dra. LEONOR CASILLA LOYOLA, pelo auxílio das análises.

À secretária ROSELI PASCHOA e SANDRA DA SILVA, pelo auxílio na formatação da tese e orientações sobre a pós-graduação.

A todos os demais participantes da equipe de pesquisa, fundamentais nessa caminhada.

A todos os residentes, colegas e funcionários da Disciplina de Medicina Esportiva.

Às minhas irmãs, CÍNTIA e GISELA, pelo o amor fraterno que nos une.

Ao Sr. BINOTTO e Dona REGINA, BIANCA e BRUNO, por todo carinho e companheirismo e atenção em nossa família.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional e à Coordenadora, Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA, pela oportunidade de desenvolver essa pós-graduação.

À agência de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste estudo.

A todos os sujeitos que aceitaram participar deste estudo.

“Ideias e somente ideias podem iluminar a escuridão”

(Ludwig von Mises)

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| DEDICATÓRIA..... | III |
| AGRADECIMENTOS | IV |
| LISTA DE FIGURAS | IX |
| LISTA DE TABELAS | X |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | XI |
| RESUMO | XIII |
| <i>ABSTRACT</i> | XV |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 2 OBJETIVO | 05 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 06 |
| 2.2 Objetivos específicos | 06 |
| 3 LITERATURA | 07 |
| 3.1 Anatomia..... | 08 |
| 3.1.1 Classificação topográfica | 11 |
| 3.2 Histologia..... | 12 |
| 3.2.1 Alterações histológicas nas lesões do manguito rotador..... | 13 |
| 3.3 Fisiopatologia..... | 14 |
| 3.3.1 Teoria extrínseca: impacto subacromial | 14 |
| 3.3.2 Teoria intrínseca: alterações intratendínea..... | 15 |
| 3.3.3 Fatores de risco intrínsecos e ambientais..... | 17 |
| 3.3.3.1 A influência do tabagismo | 17 |
| 3.4 Bases genéticas das doenças de herança complexa | 19 |
| 3.4.1 Bases genéticas e aspectos translacionais relacionados à lesão do manguito rotador | 20 |
| 3.4.2 Estudos moleculares relacionados à lesão do manguito rotador..... | 22 |
| 3.5 Genes e proteínas estudados | 28 |
| 3.5.1 Genes e proteínas codificadores de colágeno | 28 |
| 3.5.1.1 COL1A1 e COL1A2 | 28 |
| 3.5.1.2 COL3A1..... | 29 |
| 3.5.1.3 COL5A1..... | 29 |

| | |
|---|------------|
| 3.5.2 Genes e proteínas codificadoras de glicoproteínas da matriz extracelular (FN1 e TNC) | 30 |
| 3.5.3 Família TGFB | 32 |
| 3.5.3.1 <i>GDF5</i> | 34 |
| 4 MÉTODO..... | 35 |
| 4.1 Pacientes | 36 |
| 4.2 Amostras de tecido..... | 39 |
| 4.3 Análises histológicas, de fibras de colágeno e imuno-histoquímica (IHC)..... | 40 |
| 4.4 Análise da expressão gênica | 42 |
| 4.5 Análise estatística..... | 44 |
| 5 RESULTADOS..... | 45 |
| 5.1 Expressão de mRNA e proteína em amostras de tendão: comparação entre casos e controles externos..... | 48 |
| 5.2 Expressão alterada de mRNA em diferentes amostras de tendão de pacientes com lesões do manguito rotador | 52 |
| 5.3 Alteração da expressão gênica e proteica em achados histológicos associados a lesões dos tendões do manguito rotador..... | 53 |
| 5.4 O efeito clínico nos resultados | 55 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 58 |
| 7 CONCLUSÃO | 66 |
| 8 REFERÊNCIAS | 68 |
| NORMAS ADOTADAS | 85 |
| APÊNDICES | 87 |
| ANEXOS..... | 97 |
| FONTES CONSULTADAS | 110 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Osteologia da escápula..... | 8 |
| Figura 2 – Fotografia de dissecação anatômica do ombro em anteroposterior..... | 10 |
| Figura 3 – Fotografia de dissecação anatômica do ombro em perfil..... | 12 |
| Figura 4 – Correlação entre a idade dos pacientes e o tamanho das lesões do manguito rotador..... | 46 |
| Figura 5 – Características histológicas dos tendões do supraespinal dos pacientes com lesão do manguito rotador..... | 48 |
| Figura 6 - Expressão gênica em amostras de tendão de indivíduos com e sem lesão do manguito rotador..... | 49 |
| Figura 7 – Imunorreatividade proteica em amostras de tendão de indivíduos com lesão do manguito rotador..... | 51 |
| Figura 8 – Características histológicas e expressão gênica..... | 54 |
| Figura 9 – Efeito da duração dos sintomas..... | 55 |
| Figura 10 – Efeito do tabagismo na MEC de amostras de tendão de indivíduos com lesão do manguito rotador..... | 56 |
| Figura 11 – Amostras de tecido do tendão do supraespinal de pacientes com o ombro afetado dominante e não dominante..... | 57 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Distribuição das variáveis clínicas de pacientes com ruptura do manguito rotador e indivíduos controles..... | 38 |
| Tabela 2 – Genes avaliados e ensaios utilizados. | 43 |
| Tabela 3 – Distribuição das variáveis histológicas entre pacientes com lesão do manguito rotador e controles. | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------------|---|
| ACTB | Beta Actina |
| C5 | Raiz nervosa da quinta vértebra cervical |
| C6 | Raiz nervosa da sexta vértebra cervical |
| C7 | Raiz nervosa da sétima vértebra cervical |
| CE | Controle Externo |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementar |
| COL1 | Colágeno, Tipo I, |
| COL3 | Colágeno, Tipo III |
| COL1A1 | Colágeno, Tipo I, Alfa |
| COL1A2 | Colágeno, Tipo I, Alfa 2 |
| COL3A1 | Colágeno, Tipo III, Alfa |
| COL5A1 | Colágeno, Tipo V, Alfa 1 |
| COX2 | Citocromo Oxidase 2 |
| DEFB1 | Defensina, Beta 1 |
| DENND2C | DENN: proteína DENN contendo domínio 2C |
| DP | Desvio-Padrão |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ESRRB | Receptor relacionado ao estrogênio tipo beta |
| FCRL3 | Receptor similar FC3 |
| FFPE | Fixadas em Formalina e Embebidas em Parafina |
| FGF3 | Fator de crescimento de fibroblasto 3 |
| FGF10 | Fator de crescimento de fibroblasto 10 |
| FGFR1 | Receptor do fator de crescimento de fibroblasto |
| FN | Fibronectina |
| FN1 | Fibronectina 1 |
| GADPH | Desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato |
| GDF5 | Fator de crescimento e diferenciação, 5 |
| HPRT1 | Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase |
| IHC | Imuno-Histoquímica |

| | |
|-----------------------|--|
| iNOS | Indutor de óxido nítrico sintase |
| IIQ | Intervalo interquartil |
| MA | Manguito anterior |
| MEC | Matriz Extracelular |
| MC | Manguito central |
| MLG | Modelo Linear Generalizado |
| mm | Milímetros |
| <i>MMP1</i> | Metaloproteinase, 1 |
| <i>MMP2</i> | Metaloproteinase, 2 |
| <i>MMP3</i> | Metaloproteinase, 3 |
| <i>MMP9</i> | Metaloproteinase, 9 |
| <i>MMP13</i> | Metaloproteinase, 13 |
| <i>MMP</i> | Metaloproteinases |
| MP | Manguito posterior |
| mRNA | RNA Mensageiro |
| PCR | Reação em cadeia polimerase |
| Nm | Nanômetros |
| qRT-qPCR | Reação em cadeia polimerase quantitativa via transcriptase reversa em tempo real |
| RM | Ressonância Magnética |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| SNPs | Polimorfismos de nucleotídeo único |
| <i>TBP</i> | proteína ligante da sequência TATA |
| <i>TGFB1</i> | Fator de crescimento transformante, Beta 1 |
| <i>TGFB2</i> | Fator de crescimento transformante, Beta 2 |
| <i>TGFB3</i> | Fator de crescimento transformante, Beta 3 |
| <i>TGFBRI</i> | Fator de crescimento transformante, Receptor Beta 1 |
| <i>TGFBRII</i> | Fator de crescimento transformante, Receptor Beta 2 |
| <i>TIMP2</i> | Inibidor de Metaloproteinase 2 |
| <i>TNC</i> | Tenascina C |
| Usg | Ultrassonografia |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |

RESUMO

Introdução: A lesão do manguito rotador é causa comum de dor e disfunção do ombro. Fatores extrínsecos e intrínsecos têm sido propostos para explicar sua etiologia. A falha na síntese de compostos da matriz extracelular pode contribuir para a degeneração dos tendões. **Objetivo:** Avaliar a expressão de genes da matriz extracelular e da família *TGFB* em tendões rotos e não rotos do manguito rotador, bem como o efeito de fatores clínicos na expressão gênica de amostras dos tendões e relacioná-los entre os achados histológicos e às alterações da expressão gênica. **Método:** Amostras de tendão supraespinal lesionado e não lesionado e amostras de tendão subescapular não lesionado foram coletadas de 38 pacientes com ruptura do manguito rotador. Amostras de tendões não lesionados também foram obtidas de oito indivíduos controles. Os espécimes foram utilizados para avaliação histológica, quantificação de fibras de colágeno e análises de expressão das proteínas FN1, TNC, TGFB1, TGFBR1 e mRNA de *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *TNC*, *FN1*, *TGFB1*, *TGFBR1* e *GDF5*. **Resultados:** O aumento da expressão de mRNA de *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *FN1*, *TNC* e *TGFBR1* foi observado nas amostras com lesão em relação às amostras de tendão não lesionado de indivíduos controles ($p < 0,05$). A duração dos sintomas foi diretamente correlacionada com os níveis de fibras de COL1 / COL3 ($p = 0,032$; $p = 0,0447$) e imunomarcação de *FN1* ($p = 0,031$; $p = 0,417$). Tabagismo foi associado com aumento da frequência de microcistos, degeneração mixoide e expressão de mRNA de *COL5A1*, *FN1*, *TNC* e *TGFB* ($p < 0,05$). A imunexpressão de FN1 foi diretamente correlacionada com o número de anos de tabagismo ($p = 0,048$; $p = 0,0384$). Níveis mais baixos de fibras de COL1 / COL3 foram detectados

em amostras com fissuras ($p = 0.046$). A alta frequência de microcistos foi associada ao aumento da expressão de *COL5A1*, *FNI* e *TNC* ($p < 0,05$, para todas as comparações). A presença de neovascularização foi associada à redução da expressão de *FNI* ($p = 0,035$) e *TGFBR1* ($p = 0,034$). **Conclusão:** A expressão alterada dos genes *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *TNC*, *FNI*, *TGFB1*, *TGFBR1* está envolvida no processo de degeneração nas rupturas do manguito rotador. Variáveis clínicas como tempo de lesão, dominância e tabagismo interferem no processo degenerativo dos tendões.

ABSTRACT

Introduction: Lack of synthesis of extracellular matrix compounds may contribute to degeneration of the tendons. **Objective:** we aimed to evaluate the expression of extracellular matrix and *TGFB* family members in ruptured and non-ruptured tendons of the rotator cuff, as well as the effect of clinical factors on gene expression in tendon samples, and the relationship between histological findings and altered gene expression. **Methods:** Injured and non-injured supraspinatus tendon samples and subscapular non-injured tendon samples were collected from 38 patients with rotator cuff tears. Non-injured supraspinatus tendons were obtained from eight controls. Specimens were used for histological evaluation, quantification of collagen fibers, and mRNA and protein expression analyses. **Results:** Increased *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *FNI*, *TNC*, and *TGFBR1* mRNA expression was observed in the tear samples ($p < 0.05$). Duration of symptoms was correlated with the levels of collagen type I/III fibers ($p = 0.032$; $p = 0.0447$) and *FNI* immunostaining ($p = 0.031$; $p = 0.417$). Smoking was associated with increased frequency of microcysts, myxoid degeneration, and *COL5A1*, *FNI*, *TNC*, and *TGFBR1* mRNA expression ($p < 0.05$). *FNI* immunostaining was correlated with the number of years of smoking ($p=0.048$; $p=0.384$). Lower levels of collagen type I/III fibers were detected in samples with fissures ($p=0.046$). High frequency of microcysts was associated with increased *COL5A1*, *FNI*, and *TNC* expression ($p < 0.05$, for all comparisons). Neovascularization was associated with reduced *FNI* ($p=0.035$) and *TGFBR1* expression ($p=0.034$). **Conclusion:** Our findings show differential expression of matrix extracellular genes and *TGFB* family

members in the degeneration process involved in rotator cuff tears. These molecular alterations are influenced by clinical factors.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A lesão do manguito rotador é uma causa comum de dor e disfunção do ombro, especialmente em pessoas idosas e sedentárias. Muitos fatores extrínsecos (por exemplo, fatores demográficos e o impacto subacromial) e fatores intrínsecos (por exemplo, degeneração relacionada à idade, hipovascularidade, inflamação e estresse oxidativo) têm sido propostos para explicar a causa e a progressão das lesões do manguito rotador (SHINDLE *et al.*, 2011).

A afecção apresenta-se como a mais frequente lesão do ombro. Mais de 50% dos indivíduos acima de 60 anos apresentam pelo menos lesões parciais com significativa diminuição da função e impacto na qualidade de vida. Já a incidência de lesões completas varia entre 5% a 40%, sendo que o aumento de sua frequência apresenta relação com o avançar da idade (ARCE *et al.*, 2003). De acordo com LONGO *et al.* (2017), a doença afeta de 30 a 50% dos indivíduos acima de 50 anos e mais de 50% dos indivíduos acima dos 80 anos.

JEROSCH *et al.* (1993) examinaram 122 cadáveres comparando a incidência desses em relação à literatura. O estudo encontrou 28,7% (35 pacientes) com lesões parciais e 30,3% (37 pacientes) com lesões completas em pacientes acima de 60 anos. LEHMAN *et al.* (1995) examinaram 456 ombros e encontraram 17% (78 espécimes) com lesões completas, sendo que essa porcentagem aumentou para 30% em pacientes acima de 60 anos.

As lesões sintomáticas do manguito rotador são comuns durante a prática clínica diária. De acordo com DIAS *et al.* (2008), é a afecção mais frequente causadora de dor durante as atividades cotidianas, tendo maior

prevalência em mulheres, no lado dominante. EJNISMAN *et al.* (2004) descrevem que, apesar de um grande número de artigos relacionados ao tema, não existe um consenso em relação à melhor abordagem a ser realizada nesses pacientes.

Atualmente, não há um consenso entre os fatores intrínsecos que podem levar à degeneração tendínea e a consequente ruptura dos tendões que compõem o manguito rotador. Existem evidências preliminares da contribuição genética, sendo necessário mais estudos que busquem o maior conhecimento de alterações moleculares na gênese da lesão.

A presente tese foi derivada de um estudo multidisciplinar envolvendo a Disciplina de Medicina Esportiva e Atividade Física do Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Disciplina de Genética do Departamento de Morfologia e Genética e a Disciplina de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia, todos da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Essa parceria deu origem à linha de pesquisa intitulada “*Aspectos genéticos e moleculares em lesões musculoesqueléticas*” que tem por objetivo unir a ciência básica e clínica para aprofundar o conhecimento de diversas doenças ortopédicas.

Dentro da referida linha de pesquisa, esse estudo faz parte de um projeto, denominado “*Lesões ortopédicas no ombro*”, sendo esse, subdividido nas lesões traumáticas e não traumáticas, a qual inclui a lesão do manguito rotador. Assim, buscamos avaliar tanto se variantes genéticas (polimorfismos) de DNA estão associadas ao risco da lesão do manguito rotador, quanto avaliar alterações na expressão gênica/ proteica e epigenéticas que podem estar associadas com a ruptura do tendão propriamente dita (objeto de pesquisa desta tese de doutorado).

No presente estudo, focamos na análise de alterações moleculares envolvidas nos tendões de pacientes portadores de lesão completa do manguito rotador de origem não traumática. Para comprovar nossas hipóteses, utilizamos um estudo caso-controle avaliando a borda do tendão rompido do manguito rotador com amostras macroscopicamente normais do tendão do manguito rotador dos mesmos pacientes, bem como com amostras de tendões não lesionados de indivíduos controles. A inclusão de amostras de tendão de indivíduos sem histórico de lesões do ombro foi necessária uma vez que mesmo macroscopicamente e/ou histologicamente não lesionados, regiões tendíneas adjacentes ao sítio da lesão poderiam já apresentar alterações moleculares relacionadas a um próprio processo degenerativo ao longo de toda articulação.

Os dados gerados a partir deste estudo são originais e permitem uma maior compreensão dos processos biológicos subjacentes da lesão do manguito rotador. O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença poderá, no futuro, servir de base para novas formas de diagnóstico e alvos terapêuticos.

OBJETIVO

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar fatores moleculares relevantes para a fisiopatologia da lesão do manguito rotador.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Comparar a expressão de *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *TNC*, *FN1*, *TGFB1*, *TGFBR1* e *GDF5* entre a borda do tendão rompido do manguito rotador, com amostras macroscopicamente normais do tendão do manguito rotador dos mesmos pacientes, bem como com amostras de tendões não lesionados de indivíduos controles;
- 2) Avaliar a expressão dos produtos proteicos de FN1, TNC, TGFB1, TGFBR1 e quantificar as fibras de colágeno, para confirmar o envolvimento genético na etiologia das lesões;
- 3) Avaliar possíveis associações entre achados histológicos e alterações moleculares;
- 4) Investigar o efeito de aspectos clínicos na expressão gênica/proteica em amostras de tendões do manguito rotador.

LITERATURA

3 LITERATURA

3.1 Anatomia

A cintura escapular é formada pelos ossos da clavícula, escápula e a extremidade proximal do úmero. A escápula divide-se em corpo, processo coracoide e espinha, que é uma lâmina triangular e continuada lateralmente como acrômio. A extremidade proximal do úmero consiste da cabeça, colo anatômico e dois tubérculos, maior e menor, separados um do outro pelo sulco intertubercular (GARDNER *et al.*, 1978). A figura 1 apresenta uma visão posterior da escápula, demonstrando a espinha e as fossas supra e infra espinal.

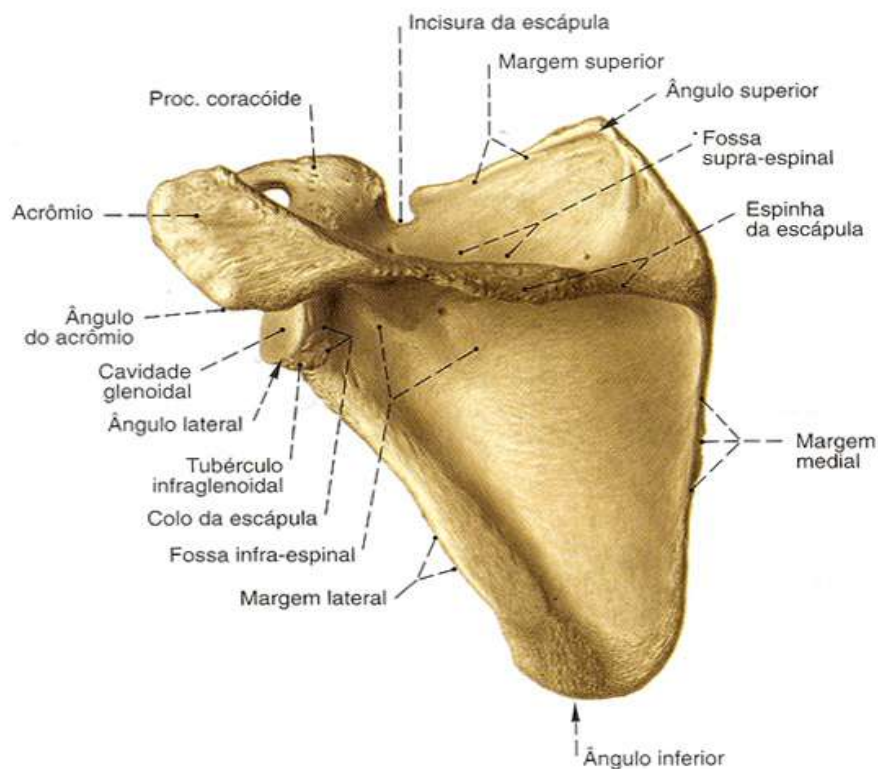


Figura 1 - Osteologia da escápula

Fonte: Netter (2015).

O manguito rotador é composto pela inserção de quatro tendões no úmero: supraespinal, infraespinal, subescapular e redondo menor, formando uma cobertura sobre a cabeça umeral. Anteriormente, próximo à junção subescapular/supraespinal, passa o tendão da cabeça longa do bíceps braquial, sede frequente de afecções associadas à lesão do manguito rotador sendo que todos os músculos que compõem o manguito rotador se originam na escápula e se inserem no úmero. O músculo supraespinal origina-se na escápula, superiormente à espinha, e se insere na porção superior do tubérculo maior. É innervado pelo nervo supraescapular (ramo de C5 e C6). O supraespinal atua juntamente com o deltoide para a abdução do ombro, especialmente nos primeiros 15 graus e auxilia na rotação lateral do ombro. O músculo infraespinal origina-se na escápula, inferiormente à espinha, e se insere no tubérculo maior entre a inserção dos músculos supraespinal e redondo menor, sendo também innervado pelo nervo supraescapular. Já o redondo menor é originário da borda axilar da escápula e se insere na porção inferior da tuberosidade maior. É innervado pelo nervo axilar (ramo de C5 e C6) (CLARK *et al.*, 1992). O infraespinal participa da rotação lateral do ombro, especialmente quando em abdução neutra. (KELLY *et al.*, 1996)

O subescapular origina e preenche a fossa subescapular da escápula, e se insere na tuberosidade menor do úmero. É innervado pelos nervos subescapulares superior e inferior (ramos de C5, C6 e C7). Atua na adução e rotação medial do ombro, fornecendo uma importante restrição à translação anterior da cabeça do úmero, sendo o limite anterior do intervalo dos rotadores, que é um espaço triangular entre os tendões do manguito rotador, localizado na região anterossuperior da articulação glenoumeral (ASZMANN *et al.*, 1996). Por outro lado, o redondo menor auxilia na rotação lateral do ombro com o braço abduzido (LEE *et al.*, 2000).

Esse conjunto de quatro tendões descritos acima tem como função a de atuar como um estabilizador dinâmico da articulação glenoumeral, auxiliando na manutenção da cabeça umeral centrada na glenoide, opondo-se à translação superior e à formação de cisalhamento, pela compressão da cabeça umeral. Além disso, o manguito rotador promove um suporte para cápsula, prevenindo o excessivo movimento anteroposterior da cabeça umeral (BOON *et al.*, 2004).

Os tendões dos músculos supraespinal, infraespinal e redondo menor se inserem conjuntamente na tuberosidade maior do úmero, em uma região denominada de “*footprint*” (CURTIS *et al.*, 2006; DARK *et al.*, 2007).

A figura 2 apresenta uma visão anterior do ombro, demonstrando a inserção dos tendões do supraespinal e subescapular no úmero.



Figura 2 - Fotografia de dissecação anatômica, de autoria própria, demonstrando os tendões que compõem o manguito rotador

3.1.1 Classificação topográfica

HABERMEYER *et al.* (1990) descreveram uma classificação topográfica das lesões do manguito rotador no plano sagital, dividindo-as em três setores:

- Setor A: lesões localizadas anteriormente (incluem o tendão do subescapular, intervalo dos rotadores e tendão da cabeça longa do bíceps – manguito anterior – MA);
- Setor B: lesões localizadas em região central (inclui o tendão do supraespinal – manguito central – MC);
- Setor C: lesões localizadas na região posterior (incluem o tendão do infraespinal e redondo menor – manguito posterior – MP).

Durante a realização do presente trabalho, utilizamos a referida classificação, dada a sua maior facilidade em localizar a região de onde foram realizadas as coletas das amostras dos tendões. A figura 3 demonstra as três regiões descritas previamente por HABERMEYER *et al.* (1990).

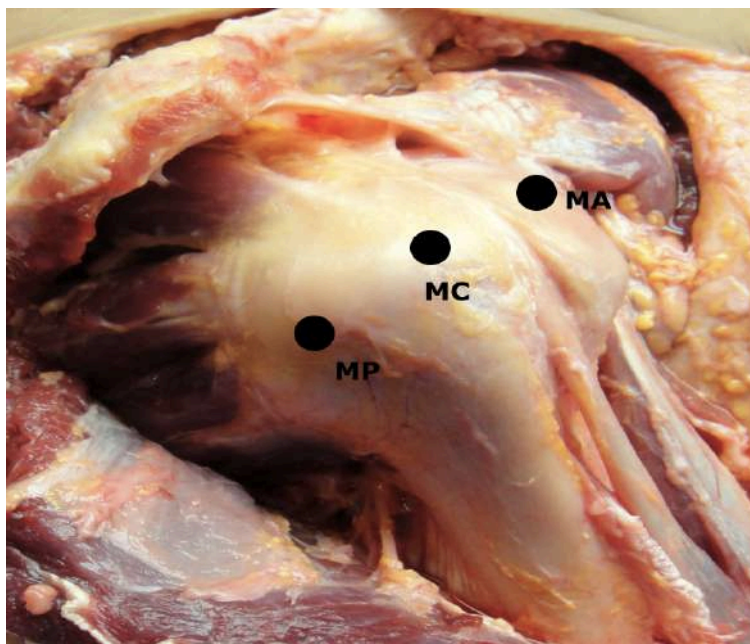


Figura 3 - Fotografia de dissecção anatômica, de autoria própria, demonstrando as três zonas descritas por Habermeyer *et al.* (1990).

MA: manguito anterior; MC: manguito central; MP: manguito posterior.

3.2 Histologia

BLEVINS *et al.* (1997) descreveram que de modo geral, a estrutura tendínea é constituída de tenoblastos e tenócitos dentro de uma rede de matriz extracelular (MEC). A MEC de tendões é composta principalmente de colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e várias outras moléculas pequenas (GARRETT *et al.*, 2000).

SCREEN *et al.* (2004) demonstraram que a estrutura e a composição da MEC são diretamente responsáveis pelo controle dos sinais que chegam às células, gerando redes complexas, ligando o destino das células e da MEC no tendão.

Os tendões conectam o músculo ao osso, carregando algumas das maiores forças experimentadas por qualquer tecido vertebrado (KER, 2007). Aproximadamente 95% do colágeno é do tipo I, com pequenos níveis de colágeno tipo III, V, XI, XII e XIV (HAN *et al.*, 2010). THORPE *et al.* (2013) descreveram que intercalada entre as unidades de colágeno, em toda a hierarquia estrutural dos tendões está uma variedade de outros componentes da matriz não colagenosa.

GALLOWAY *et al.* (2013) descreveram que o colágeno forma estruturas semelhantes a fibras, que são alinhados próximo ao longo eixo do tecido (direção de tração), conferindo resistência mecânica ao tendão sendo que as células do tendão governam a produção e organização da MEC em resposta a estímulos mecânicos e químicos.

De acordo com SCREEN *et al.* (2015), o tendão possui uma rede complexa de células e a MEC, desempenhando vários papéis funcionais diferentes, sendo que a composição e organização apropriadas da MEC permite que um tendão desempenhe sua função mecânica de transferência de força, além de garantir a sua função biológica.

3.2.1 Alterações histológicas nas lesões do manguito rotador

JÄRVINEN *et al.* (1997) descreveram que o aumento da densidade celular, alterações na morfologia, apoptose e necrose são achados característicos de tendões rotos do manguito rotador.

Um aumento na quantidade e duração da carga que uma célula de tendão experimenta pode resultar na ativação de proteínas quinases, ativadas por estresse, radicais livres de oxigênio e mediadores apoptóticos que,

quando persistentemente ativados, fazem com que as células tendíneas sofram apoptose (ARNOCZKY *et al.*, 2002; SZOMOR *et al.*, 2006).

O aumento da degradação da MEC e subsequente falta da síntese pode levar à deterioração estrutural e degeneração dos tendões (XU *et al.*, 2008). Esse fato resulta em uma matriz colagenosa enfraquecida, levando à degeneração tendínea e, subsequentemente, à ruptura do tendão (MILLAR *et al.*, 2008).

LONGO *et al.* (2008) descreveram que a distribuição de colágeno em tendões rotos é anormal, e que seus tenócitos produzem maiores quantidades de COL3, em relação a tendões normais.

NAGURA *et al.* (2016) demonstraram que as células do manguito rotador humano são células-tronco mesenquimais, multipotentes, com capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens, sugerindo que as células mesenquimais que formam esse tecido podem ter uma capacidade regenerativa de potencial reparo.

3.3 Fisiopatologia

Inicialmente, duas teorias foram defendidas a respeito da etiologia das lesões do manguito rotador: teoria extrínseca e teoria intrínseca.

3.3.1 Teoria extrínseca: impacto subacromial

A teoria extrínseca descreve que a lesão do manguito rotador ocorre pelo impacto do arco coracoacromial “duro” contra o tendão do supraespal.

NEER (1972) dividiu em três as fases evolutivas da síndrome compressiva do manguito rotador:

- Fase I: edema e hemorragia reversíveis; ocorre em pacientes jovens, tendo boa evolução com o tratamento clínico;
- Fase II: fibrose e tendinite; ocorre de maneira crônica e intermitente, normalmente em indivíduos com idade entre 25 e 45 anos;
- Fase III: ruptura completa do manguito; ocorre em pacientes acima de 40 a 50 anos.

NYFFELER *et al.* (2006) e TORRENS *et al.* (2007) encontraram uma relação direta entre a projeção lateral do acrômio, denominado índice acromial e as lesões do manguito rotador, relacionando-as ao impacto subacromial. Por outro lado, MIYAZAKI *et al.* (2011) compararam o índice acromial entre as populações brasileira e japonesa e concluíram que o mesmo pode ser um fator preditivo na gênese das lesões do manguito rotador na população brasileira, mas não na japonesa, fato que sugere que outros fatores podem estar relacionados à etiologia da lesão do manguito rotador.

3.3.2 Teoria intrínseca: alterações intratendínea

É descrito na literatura que a área de 15mm da inserção do supraespinal e infraespinal no tubérculo maior é relativamente hipovascular. Desde a descrição clássica de CODMAN (1934) sobre a assim chamada “zona crítica” e a hipovascularização local do manguito rotador, muito se tem estudado e especulado sobre a possibilidade de a isquemia ser uma das causas dessa lesão.

CHANNISKY *et al.* (1991) descreveram que a hipovascularização da “área crítica de Codman” é considerada como o ponto inicial da degeneração e da ruptura do manguito.

IKEMOTO *et al.* (2007) avaliaram 31 pacientes submetidos ao reparo artroscópico da lesão do manguito rotador e encontraram que na maioria das bordas dos tendões do supraespinal é hipervascularizada.

GODINHO *et al.* (2007) descreveram que cerca de 80% das lesões de manguito rotador, avaliadas em sua série de 25 biópsias, apresentaram pouca ou nenhuma vascularização em suas bordas.

LONGO *et al.* (2008) avaliaram por meio de estudo caso-controle, a borda dos tendões de 88 pacientes submetidos ao reparo artroscópico e compararam com cinco cadáveres que faleceram por causas cardiológicas e encontraram alterações histológicas que demonstram que pacientes portadores e não portadores de lesão do manguito rotador fazem parte de dois tipos de população distintas. Os autores hipotetizaram que, durante o reparo artroscópico do manguito rotador, não é necessário ressecar excessivamente as bordas do tendão rompido, buscando um tecido com melhor vascularização, já que na presença de uma ruptura do manguito rotador, o tendão do supraespinal macroscopicamente intacto é degenerado também.

MAFFULLI *et al.* (2008) descreveram que os tendões do manguito rotador possuem em sua região insercional sinais de degeneração, incluindo morte celular, depósito de cálcio e rupturas microscópicas. MAFFULLI *et al.* (2010) relataram que o número e o tamanho dos vasos estão diminuídos no tendão acometido.

MAFFULLI *et al.* (2011a) demonstraram que a diminuição do suprimento sanguíneo é um fator relacionado à doença degenerativa dos

tendões e que a capacidade de reparo após microtraumas de repetição está comprometida devido às alterações vasculares que provoca.

3.3.3 Fatores de risco intrínsecos e ambientais

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento das lesões do manguito rotador ainda não são totalmente compreendidos. Idade, sexo, aumento do índice de massa corporal, sexo feminino, tabagismo, dislipidemia e diabetes são fatores de risco bem descritos (TEMPELHOF *et al.*, 1999; WENDELBOE, 2004; BAUMGARTEN *et al.*, 2010; MINAGAWA *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2016).

3.3.3.1 A influência do tabagismo

MALLON *et al.* (2004) analisaram de forma retrospectiva os efeitos do tabagismo nos resultados do reparo aberto das lesões do manguito rotador, por meio da escala funcional da Universidade da Califórnia (UCLA) e escala subjetiva de dor e observaram melhor evolução nos pacientes não fumantes.

GALATZ *et al.* (2006) descreveram os efeitos adversos da nicotina no reparo do manguito rotador em ratos. Segundo os autores, a nicotina é responsável pela redução das propriedades mecânicas e da redução da concentração de colágeno em ratos. Os autores descreveram que os efeitos negativos do tabaco ocorrem devido às propriedades vasoconstritoras da nicotina, que diminuem o suprimento sanguíneo aos tecidos, associado à

capacidade do monóxido de carbono em diminuir os níveis de oxigenação celular, acarretando um efeito adverso na cicatrização do manguito rotador.

BAUMGARTEN *et al.* (2010) avaliaram por meio de usg 586 indivíduos com dores no ombro, desses, 375 eram portadores de lesão do manguito rotador e 61,9% da amostra era composta por tabagistas. Os autores relacionaram as dores no ombro e as lesões do manguito rotador com a quantidade e o tempo do vício. Os autores concluíram que a quantidade média de maços por dia e a média de maços por ano, associados ao tempo de tabagismo, são maiores em pacientes portadores de lesão do manguito rotador, comparados aos pacientes sem lesão.

PINTO JÚNIOR *et al.* (2010) realizaram estudo retrospectivo com 166 pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico e concluíram que pacientes tabagistas apresentam pior prognóstico no reparo das lesões do manguito rotador.

CARBONE *et al.* (2012) em estudo retrospectivo avaliaram 408 pacientes submetidos ao reparo artroscópico da lesão do manguito rotador e associaram o cigarro com a presença de lesões maiores do manguito rotador.

Apesar dos estudos descritos acima, demonstrando um possível efeito na degeneração dos tendões do manguito rotador, a literatura é escassa em relação a sua influência em nível molecular, sendo essa relação demonstrada pela primeira vez pelo nosso grupo, em 2017 (LEAL *et al.*, 2017). Nesse estudo foi encontrado um aumento da expressão de *MMP1* e diminuição de *TIMP2* em tendões de pacientes tabagistas em relação a pacientes não tabagistas.

3.4 Bases genéticas das doenças de herança complexa

Um grande número de doenças do tecido conjuntivo possui um componente genético. Algumas doenças mendelianas clássicas do tecido conjuntivo estão bem descritas, como por exemplo, a osteogênese imperfeita, a síndrome de Ehlers-Danlos e a síndrome de Marfan. No entanto, outras doenças de tecido conjuntivo são complexas e multifatoriais. Nessas afecções, a identificação de componentes genéticos é mais difícil, pois a busca é dificultada pela probabilidade de envolvimento de um conjunto de genes na sua etiologia – cada gene tendo uma pequena contribuição para a condição em estudo – e pelas interações gene-ambiente (SEPTEMBER *et al.*, 2007).

Embora as doenças ortopédicas possam ser causadas por uma mutação em um único gene em algumas famílias, em geral, elas não são monogênicas. A maioria dessas afecções é o resultado de interações complexas entre vários fatores de predisposição, como os genótipos de diferentes *loci* e uma variedade de fatores ambientais que ativam, aceleram ou exacerbam o processo da doença. Assim, essas doenças, como a lesão do manguito rotador, não podem ser enquadradas em padrões de herança mendelianos, mas sim em padrões complexos ou multifatoriais (interação gene-ambiente). Uma característica das doenças complexas, incluindo a lesão do manguito rotador, é que elas podem apresentar agregação familiar, pois é mais provável que os parentes de uma pessoa afetada compartilhem com ela mais alelos de predisposição à doença do que pessoas não-aparentadas. Compreender os mecanismos pelos quais os alelos de mais de um *locus* conferem suscetibilidade/proteção à doença ou como esses alelos contribuem para a variação fenotípica é de suma importância (NUSSBAUM

et al., 2008).

Como podemos ver, a etiologia da lesão do manguito rotador é um processo multifatorial e fatores extrínsecos e intrínsecos têm sido propostos para explicá-la. Não há consenso sobre os principais fatores, e parece haver uma interação entre eles (MAFULI *et al.*, 2011b; GIORGI *et al.*, 2014).

Nosso grupo de pesquisa busca estudar os mecanismos genéticos e transcricionais envolvidos no desenvolvimento de diversas lesões ortopédicas, incluindo a lesão do manguito rotador.

3.4.1 Bases genéticas e aspectos translacionais relacionados à lesão do manguito rotador

HARVIE *et al.* (2004) avaliaram uma coorte de pacientes diagnosticados com lesão completa do manguito rotador, incluindo 129 irmãos e 150 cônjuges (controles). O estudo demonstrou que irmãos apresentaram um risco duas vezes maior de desenvolver lesão completa do manguito rotador em relação ao grupo controle. Adicionalmente, foi observado que irmãos possuem um risco cinco vezes maior de apresentarem sintomas para essa condição em relação aos controles. O aumento significativo do risco de ruptura do manguito rotador em irmãos implica que fatores genéticos possuem um papel fundamental no desenvolvimento desse tipo de lesão.

Dessa forma, em se tratando de fatores de risco, é importante enfatizar o envolvimento de variantes genéticas na gênese da lesão do manguito rotador. Os resultados de estudos anteriores fornecem evidências de que pode haver uma relação importante entre os genes e a doença do manguito

rotador. No entanto, os dados sobre essa questão ainda são limitados. Estudos prévios identificaram uma associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), que é uma variação na sequência de DNA, presente em mais de 1% da população, e lesões degenerativas do tendão do manguito rotador.

MOTTA *et al.* (2014) avaliaram 23 SNPs de 6 genes envolvidos nos processos de reparação e degenerativo do tecido musculoesquelético (*DEFB1*, *DENND2C*, *ESRRB*, *FGF3*, *FGF10* e *FGFR1*) para uma possível associação com a lesão do manguito rotador e identificaram um papel potencial para *ESRRB* no desenvolvimento da lesão do manguito rotador.

TEERLINK *et al.* (2015) em estudo populacional com 311 indivíduos portadores de lesão do manguito e 2641 indivíduos controles ratificaram a associação de variantes no *ESRRB* na doença do manguito rotador.

ASSUNÇÃO *et al.* (2017) avaliaram 64 pacientes com rupturas do manguito rotador de espessura total e encontraram sua associação com variantes genéticas de *MMP1* e *MMP3*.

KLUGER *et al.* (2017) investigaram polimorfismos selecionados nos genes *MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP9*, *MPM13*, *TIMP1*, *TNC* e *COL5A1* em pacientes com lesão do manguito rotador. Os autores encontraram 15 SNPs no gene *TNC* significativamente associados a lesões degenerativas do tendão do manguito rotador.

DABIJA *et al.* (2017), em revisão sistemática, descreveram que estudos prévios fornecem evidências preliminares da predisposição genética e familiar para a lesão do manguito rotador. Os autores salientaram a necessidade de mais estudos amplos em todo o genoma.

SALLES *et al.* (2018) analisaram atletas de vôlei alto nível de competição e encontraram que o alelo de *FCRL3 -169C* pode aumentar o

risco de tendinopatia, associado a outros fatores de risco, como idade, gênero e tempo de prática do esporte.

3.4.2 Estudos moleculares relacionados à lesão do manguito rotador

A pesquisa de tecido do tendão pode ser realizada em nível histológico ou molecular, sendo que a histologia se refere ao estudo microscópico dos tecidos, enquanto os estudos moleculares se concentram em genes, transcritos e proteínas. Estudos de genes fornecem dados sobre fatores, os quais podem predispor os indivíduos a distúrbios tendinosos, mas a informação é estática. Estudos de transcrição, por outro lado, fornecem informações sobre a expressão gênica atual. Os transcritos referem-se ao mRNA produzido pela transcrição do DNA, e são geralmente detectados usando sondas de DNA específicas ou *primers* de RNA. No entanto, os transcritos são indicadores ruins de avaliação de proteica, já que as proteínas resultantes podem ser modificadas ou degradadas, ou se acumulam na MEC (SEJERSEN *et al.*, 2015).

O conhecimento de alterações moleculares relacionadas às lesões do manguito rotador pode aumentar a compreensão da patogênese da degeneração tendínea, sendo essencial não somente para compreender a etiologia da doença, mas também contribuir para guiar a conduta terapêutica ou para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. Em um estudo preliminar, nosso grupo descreveu um aumento da expressão de mRNA de *COL1A1* e *COL3A1* em tendões lesionados (LEAL *et al.*, 2015). Convém ressaltar que nosso grupo, antes de mais estudos de expressão gênica, definiu genes de referência para esse tipo de análise envolvendo diferentes amostras

de tendão de indivíduos com lesão do manguito rotador e, com isso, evitando possíveis vieses técnicos que não foram considerados em estudos moleculares prévios da literatura (RILEY *et al.*, 2002; LO *et al.*, 2004; LO *et al.*, 2005; SHINDLE *et al.*, 2011; SHIRACHI *et al.*, 2011; ROBERTSON *et al.*, 2012; GOTOH *et al.*, 2013; FABIS *et al.*, 2014; CHAUDHURY *et al.* 2016).

RILEY *et al.* (2002) avaliaram em estudo caso-controle de qRT-qPCR sem normalização da amostra, com 10 pacientes portadores de lesão e 24 indivíduos controles e encontraram diminuição da expressão dos genes *MMP2*, *MMP9*, *MMP13*.

LO *et al.* (2004) realizaram estudo caso-controle de transcrição por meio de qRT-qPCR, com tecido de 10 pacientes portadores de lesão completa do manguito rotador e 6 cadáveres e encontraram o aumento da expressão de *MMP13* e inibição da expressão de *MMP3*, *TIMP2*, *TIMP3*, *TIMP4*, sendo utilizado como gene de referência *GADPH*.

LO *et al.* (2005) analisaram em estudo caso-controle de transcrição por meio de qRT-qPCR e avaliação proteica por meio de IHQ com tecido de 10 pacientes portadores de lesão completa do manguito rotador e 6 cadáveres. Os autores encontraram aumento da expressão de *MMP13*, *COL1A1*, *COL3A1* e aggrecan, além da inibição da expressão de decorina, sendo a amostra normalizada pelo gene *GADPH*.

SHINDLE *et al.* (2011), avaliaram em estudo caso-controle por meio de qRT-qPCR comparando 24 pacientes portadores de lesão completa e 16 pacientes portadores de lesão parcial do tendão do supraespinal, tendo o tendão do subescapular do mesmo paciente como controle interno e encontraram aumento da expressão de *MMP9*, *MMP13*, *COX2* e *COL1A1*

bem como a diminuição da expressão de *iNOS*, *VEGF*, *COL3A1* e biglican. Nesse estudo a amostra foi normalizada pelo gene *GADPH*.

SHIRACHI *et al.* (2011) em estudo caso-controle analisaram a expressão de *COL1A1* e *COL3A1* na borda da lesão do tendão do supraespinal lesado em 12 pacientes, tendo como controle 5 cadáveres frescos por meio de qRT-qPCR, sendo que a amostra foi normalizada pelo gene *ACTB*. A análise proteica foi realizada por meio *Western blot*. Adicionalmente, os autores correlacionaram a expressão desses genes com parâmetros clínicos e a integridade do reparo por meio de RM após um ano de pós operatório. Os autores correlacionaram a expressão desses genes com a integridade do reparo após o período de um ano de pós-operatório. Em adição, a expressão de *COL1A1* foi associada com o tempo de início dos sintomas, sugerindo que o tratamento conservador não deva ser prolongado se os pacientes não apresentarem melhora após determinado período.

ROBERTSON *et al.* (2012) avaliaram em 35 pacientes portadores de lesão completa do manguito rotador a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, genes de remodelação tecidual e fatores de angiogênese por meio de qRT-qPCR, normalizando a amostra por meio do gene *GADPH* e correlacionaram com a integridade do reparo com exame de usg após seis meses de cirurgia. Os autores encontraram correlação do aumento da expressão de MMP1 e MMP9 e falha da cicatrização do reparo. Nesse estudo os autores não utilizaram grupo controle.

DEAN *et al.* (2012), em estudo de revisão sistemática elegeram, de acordo com critérios prévios de avaliação, 101 artigos relacionados à expressão gênica e lesão do manguito rotador, tanto em pacientes, cadáveres ou modelos em animais. Os autores descreveram o envolvimento de componentes e enzimas da matriz extracelular, fatores de transcrição,

citocinas, fatores de crescimento, fatores neuronais e de genes relacionados à apoptose na tendinopatia/ruptura do manguito rotador.

GOTOH *et al.* (2013), em estudo com 24 pacientes portadores de lesão completa do manguito rotador, avaliaram a expressão gênica por meio de qRT-qPCR, normalizando a amostra por meio do gene *ACTB*. Após um ano de pós-operatório, a cicatrização do reparo foi analisada por meio de RM. Os autores encontraram aumento da expressão de *MMP3* e *TIMP1* nos pacientes que tiveram rerrotura. A expressão dos genes de colágeno não foi relacionada a rerrotura. Nesse estudo não foi utilizado grupo controle.

FABÍS *et al.* (2014) avaliaram a expressão gênica por meio de qRT-qPCR, com a amostra normalizada por meio do gene *GADPH* em nove pacientes portadores de lesão completa do supraespinal, sem a presença de grupo controle. Nesses pacientes foram avaliados a expressão de moléculas pró-apoptóticas, anti-apoptóticas, pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em três localizações de distal para medial da lesão e encontraram que os tenócitos apresentam redução da expressão de moléculas pró-apoptóticas, pró-inflamatórias e aumento das pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, ressecando-se de 4 a 7 mm da borda da lesão.

SEJERSEN *et al.* (2015), em estudo de revisão sistemática, identificaram 2.199 estudos de análise de proteínas em tendinopatias e verificaram uma tendência de aumento da expressão de COL1, COL3, MMP1, MMP9, MMP13, TIMP1, VEGF e diminuição de MMP3. Entretanto, os autores concluíram que nenhum estudo de proteômica cumpriu os critérios de inclusão, sugerindo um potencial inexplorado de pesquisa de proteínas nos tendões.

CHAUDHURY *et al.* (2016), em estudo de expressão gênica (qRT-qPCR), normalizada por *GADPH* e proteica por IHQ avaliaram 28 pacientes

portadores de lesão completa do manguito rotador, aplicando uma abordagem em larga escala, encontraram aumento de *MMP13* e diminuição da expressão de *MMP3*.

CHUNG *et al.* (2017), em estudo de expressão gênica (qRT-qPCR), normalizada por *GADPH*, proteica por IHQ e *Western blot* com 12 pacientes portadores de lesão do manguito rotador diabéticos e 12 pacientes portadores de lesão sem a doença metabólica, encontraram o aumento da expressão dos genes *MMP9* e *IL6* em diabéticos. Os autores sugeriram que essa diferença pode ser uma das explicações para o aumento da falha do reparo em pacientes diabéticos.

Nosso grupo, em 2017, descreveu por meio de estudo de qRT-qPCR, com amostra normalizada por meio dos genes *HPRT1*, *TBP* e *ACTB*, a diminuição da expressão de *MMP1*, *MMP9* e *MMP13* e o aumento de *TIMP3* em indivíduos portadores de lesão em relação com controles (LEAL *et al.*, 2017).

AHN *et al.* (2017) avaliaram, em estudo de qRT-qPCR, com a amostra normalizada por meio do gene *GADPH* de maneira retrospectiva, 14 pacientes que foram submetidos ao reparo do manguito rotador e tiveram amostras de tendão coletadas em três regiões diferentes da lesão e os dividiram em um grupo onde não houve cicatrização e no grupo em que houve a cicatrização do tendão, avaliada por RM. Os autores concluíram que a regulação negativa de genes de resposta inflamatória e a regulação positiva de genes de diferenciação celular no momento da cirurgia estão relacionados à cicatrização do manguito rotador.

TREVIÑO *et al.* (2018) avaliaram a expressão de proteases (catepsinas e *MMP*) de tecidos do tendão e músculo do supraespinal, além da cartilagem umeral de 30 ratos após lesão do manguito rotador em três

momentos distintos: 1, 3 e 12 semanas. Os autores concluíram que há um aumento significativo das proteases nos três tecidos, cada um com diferentes perfis, havendo inicialmente o aumento da expressão nos tendões e posteriormente na cartilagem umeral.

LEE *et al.* (2018), em estudo com ratos, analisaram 39.429 genes e acompanharam as alterações na expressão dos mesmos após 1 e 4 semanas de lesão e identificaram que a ruptura do manguito rotador induz a expressão de genes específicos relacionados ao envelhecimento, apoptose, atrofia e transporte de ácidos graxos. Os autores associaram que muitos genes que estão alterados possam ter um papel no processo de degeneração do tendão após a lesão.

Dessa forma, até os dias atuais, entender a gênese, o tratamento e o prognóstico das lesões do manguito rotador continua sendo um desafio. A identificação de uma possível associação genética poderia melhorar a compreensão do processo da doença que leva à lesão do manguito rotador, auxiliar na detecção precoce de indivíduos em risco para o desenvolvimento de lesões não traumáticas, identificar casos graves e fornecer potenciais terapias gênicas futuras.

Para um maior entendimento, dissertaremos a seguir sobre os genes e proteínas do presente estudo, agrupando-os em três grupos: 1) genes e proteínas codificadoras de colágeno; 2) genes e proteínas codificadoras de glicoproteínas da matriz extracelular e 3) genes e proteínas da família TGFB.

3.5 Genes e proteínas estudados

3.5.1 Genes e proteínas codificadores de colágeno

3.5.1.1 COL1A1 e COL1A2

Os genes *COL1A1* e *COL1A2* estão localizados em 17q21.31-22.05 e em 7q21.3-22.1, respectivamente (RETIEF *et al.*, 1985). A expressão do COL1 está aumentada em várias formas de fibroses, tais como pulmonar, hepática e da medula óssea (KARSENTY & PARK, 1995).

Alterações no conteúdo e composição do colágeno têm sido consistentemente encontradas na tendinopatia (XU *et al.*, 2008). MILLAR *et al.* (2016) e THANKAM *et al.* (2018a) descreveram que a desorganização da MEC, devido à alteração da composição do colágeno e a existência de inflamação sem o envolvimento ativo das células inflamatórias, são as principais características da lesão do manguito rotador.

Embora ambas as subunidades (*COL1A1* e *COL1A2*) sejam encontradas em diferentes localizações cromossômicas, os produtos transcritos desses dois genes são mantidos como proporção de 2: 1 nos níveis celulares. Ambos os genes contêm vários elementos supressores e intensificadores em suas regiões promotoras, e sítios de ligação para fatores de transcrição medianos, basais e específicos para citocinas. Os sinais regulatórios se alteram significativamente, dependendo da gravidade da lesão do manguito rotador. Como o COL1 é o principal componente do tendão do manguito rotador, os mediadores reguladores concentram-se

principalmente na restauração do mesmo após a ruptura (THANKAM *et al.* 2018b).

3.5.1.2 COL3A1

LIU *et al.* (1997) relataram que esse tipo de colágeno é encontrado em tecidos flexíveis de conexão e, frequentemente, está em associação com o COL1. Esse gene é expresso em estágios bem precoces da embriogênese e estende-se por toda ela. Mutações nesse gene estão associadas a síndrome de Ehlers-Danlos e a aneurismas arteriais e aórticos. Em recém-nascidos, o COL3 (solúvel) é sintetizado e suas fibras formadas são maleáveis e elásticas. Com o passar das décadas, as células produtoras de colágeno sintetizam menos COL3 e, progressivamente, mais COL1, que é insolúvel e por isso, mais estável.

ROBERTSON *et al.* (2012) descreveram que durante a fase de cicatrização do manguito rotador, é postulado que a expressão de *COL3A1* é aumentada e a relação aumentada de COL1 e COL3 pode ser um indicador da resposta total de reparo.

3.5.1.3 COL5A1

MOKONE *et al.* (2006) relataram que a proteína COL5A1 é fundamental na regulação do diâmetro das fibrilas de COL1, e que diferentes variantes comuns do gene *COL5A1* foram associadas às tendinopatias do calcâneo.

WENSTRUP *et al.* (2006) em estudo com pacientes portadores da síndrome de Ehlers-Danlos demonstraram que a expressão do gene *COL5A1* parece desempenhar um papel crítico na regulação da fibrilogênese.

A proteína de colágeno tipo V é codificada pelo gene do colágeno tipo V alfa 1 (*COL5A1*), localizado no braço longo (q) do cromossomo 9 e é expresso tanto em tendões quanto em ligamentos (COLLINS *et al.*, 2011), sendo que o colágeno tipo V é um dos principais constituintes dos feixes de tendões e ligamentos (LONGO *et al.*, 2015).

ALTINISIK *et al.* (2015) em estudo caso-controle com 152 pacientes portadores de epicondilite lateral identificaram que variantes genéticas do gene *COL5A1* estão associadas a doença.

Por outro lado, de acordo com PABALAN *et al.* (2018), variantes genéticas de *COL5A1* estão associadas a menor risco de lesões tendíneas e ligamentares em caucasianos, enquanto que LONGO *et al.* (2018) não encontraram aumento da susceptibilidade de lesão do manguito rotador entre variantes genéticas de *COL5A1* e indivíduos controles.

3.5.2 Genes e proteínas codificadoras de glicoproteínas da matriz extracelular (FN1 e TNC)

A TNC é expressa durante os estágios de desenvolvimento embrionário e, seletivamente, reexpressa em tecidos adultos durante várias condições patológicas, incluindo neoplasia, inflamação e reparo de feridas (MACKIE *et al.*, 1988; WHITBY *et al.*, 1991).

RILEY *et al.* (1996) descreveram o aumento da imunorreatividade de TNC em pacientes portadores de lesão completa em relação a indivíduos controles.

TILLANDER *et al.* (2002) relataram o aumento da expressão das proteínas FN1 e TNC em tendões lesados e salientaram que ambas mantêm a homeostase da MEC das articulações por meio da regulação do conjunto de fibrilas de colágeno.

HYVÖNEN *et al.* (2003) encontraram um aumento significativo de expressão da TNC em relação a lesões parciais, tendinopatias ou tendões íntegros de indivíduos controles.

INGHAM *et al.* (2004) relataram que FN1 e a TNC interagem umas com as outras e com receptores de integrina para regular o crescimento e o movimento celular.

DALLAS *et al.* (2005) descreveram que *FN1* possui um papel na regulação do *TGFB*. Já CORDOVA *et al.* (2005) demonstraram que a expressão do *FN1* aumenta sob estímulo de *TGFB*.

VAKONAKIS *et al.* (2007); MIDWOOD *et al.* (2009) descreveram o envolvimento dessas glicoproteínas estão envolvidas em vários processos biológicos, incluindo adesão celular e cicatrização de feridas. RILEY (2010) relatou que o gene *TNC* é expresso em tendões, ligamentos e meniscos, entre outros tecidos articulares.

Em estudo com pacientes portadores de capsulite adesiva, nosso grupo detectou um aumento da expressão de *FN1* e *TNC* em tecidos cápsula glenoumeral, sugerindo seu papel no processo fibrótico (COHEN *et al.*, 2016).

ZOLLINGER *et al.* (2017) descreveram que a FN1 possui como uma de suas principais características a capacidade de ligar especificamente a um grande número de moléculas, incluindo outros componentes da matriz extracelular, moléculas de sinalização e moléculas de adesão celular.

KLUGER *et al.* (2017b) avaliaram 302 pacientes de ancestralidade caucasiana submetidos ao reparo aberto do manguito rotador e concluíram que variantes genéticas de *TNC* podem modificar o risco de recidiva da lesão após um ano de pós-operatório, reforçando o papel da *TNC* na etiologia da lesão do manguito rotador.

3.5.3 Família TGFB

LE ROY *et al.*, (1990) descreveram que o gene *TGFB* induz os fibroblastos a sintetizar, remodelar e contrair a MEC, tornando esta citocina um mediador-chave da resposta fibrótica.

TGFB1, codificada pelo gene *TGFB1*, localizado em 19q13.2 é um fator de crescimento que controla a proliferação, a diferenciação e outras funções em muitos tipos de células, sendo que a desregulação da ativação de sinalização de *TGFB* pode resultar em apoptose (EBNER *et al.*, 1993).

O *TGFB* é ativado por clivagem proteolítica (CLARK *et al.*, 1994) e mediada pelos receptores de sinalização *TGFB* receptor I (*TGFBRI*) e *TGFB* receptor 2 (*TGFBRII*), de acordo com WRANA *et al.* (1994).

SHAH *et al.* (1995) avaliaram a cicatrização de feridas em ratos adultos e concluíram que a mesma é caracterizada por altos níveis de *TGFB1* e *TGFB2*, baixos níveis de *TGFB3* e extenso tecido cicatricial.

SAKAI *et al.* (2002) descreveram que o aumento de *TGFB1* acompanha a fase de inflamação aguda e parece agir como sinal de modulação da produção de macromoléculas de matriz por células fibrogênicas no local de lesão tecidual.

SOO *et al.* (2003) em estudo experimental com ratos concluíram que a cicatrização de feridas fetais é caracterizada pela baixa expressão de *TGFB1* e *TGFB2*, alta expressão de *TGFB3* e ausência de tecido cicatricial.

O *TGFB1* vem sendo associado como um fator para aumentar o potencial de cicatrização de um tendão (MOLLOY *et al.*, 2003). Em adição, o *TGFB1* regula e é regulado por várias proteínas da MEC, incluindo FN1 (CORDOVA *et al.*, 2005; DALLAS *et al.*, 2005) e TNC (CAREY *et al.*, 2010; CHIQUET-EHRISMANN *et al.* 2011).

MOORE-SMITH *et al.* (2011) descreveram que o *TGFBRI* é o principal propagador da sinalização do *TGFB* e que a atividade do *TGFB1* é mediada por dimerização com seus receptores, incluindo o *TGFBRI* (MOORE-SMITH *et al.*, 2011).

ARIMURA *et al.* (2017), em estudo com 180 ratos submetidos a reparo unilateral do manguito rotador demonstraram que o *TGFB1* aumenta a formação de tecido fibroso no tendão reparado inibindo a expressão de *MMP9* e *MMP13*, sugerindo que *TGFB1* pode ser usado como um adjuvante para aumentar a força biomecânica do reparo. Porém, é importante enfatizar que *TGFB* também atua como um fator de crescimento autócrino negativo.

3.5.3.1 *GDF5*

O fator de crescimento e diferenciação 5 (*GDF5*) é outro membro da família *TGFB*. Em estudos *in vitro*, TAN *et al.* (2012) demonstraram que o *GDF5* é um dos principais fatores na diferenciação tenogênica e na proliferação de células-tronco mesenquimais. Além disso, o *GDF5* induz a regulação positiva da expressão do mRNA de *COL1A1*, *COL3A1* e *TNC* durante o processo de diferenciação (TAN *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2015). Assim, o *GDF5* parece ser importante para a função de um tendão. No entanto, seu papel nunca foi investigado em rupturas do manguito rotador.

MÉTODO

4 MÉTODO

O presente estudo possui um delineamento de pesquisa observacional, transversal, analítica, caso-controle. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo e aprovado sob número 288.428/2013 (Apêndice 1). Todos os indivíduos forneceram consentimento informado por escrito, antes da coleta de dados e amostras (Apêndice 2).

4.1 Pacientes

Amostras de tecido do tendão do manguito rotador foram coletadas de 38 pacientes submetidos ao reparo artroscópico no Hospital São Paulo da Universidade Federal de São (UNIFESP, Brasil). Os indivíduos tinham entre 30 e 70 anos, no momento da cirurgia. Os critérios de inclusão foram: a presença de lesão de espessura total não traumáticas do tendão do supraespinal confirmadas em cirurgia; um mínimo de seis meses de tratamento não cirúrgico; ausência de uso de antibióticos (fluoroquinolonas) e / ou corticosteroides dentro de três meses; e ausência de alterações no tendão subescapular em exame de ressonância magnética (RM) e durante inspeção artroscópica. Foram excluídos os indivíduos que apresentavam possíveis fatores de confusão, como outras doenças do ombro e / ou pacientes com lesões irreparáveis. Portanto, excluímos pacientes com cirurgia prévia de ombro, artrose glenoumeral e patologias do lábio glenoidal, lesões traumáticas ou rupturas maiores que 5 cm (lesões maciças de acordo com COFIELD *et al.* (1982) e infiltração gordurosa maior que o

grau 2, de acordo com FUCHS *et al.* (1999). Todos os pacientes preencheram um questionário geral autoaplicável, abordando dados epidemiológicos e clínicos. Dados relativos à lesão e achados cirúrgicos foram posteriormente preenchidos no questionário pelo médico cirurgião. (Apêndice 3).

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados com o paciente em posição de cadeira de praia, utilizando-se para as coletas durante a artroscopia os portais posterior, anterior e lateral. Utilizou-se ótica de 30° para visualização articular. Os fragmentos foram retirados com o auxílio de uma pinça artroscópica do tipo *basket*.

Um grupo de controle externo (CE) foi composto por oito pacientes operados por fraturas do úmero proximal em duas partes, de acordo com NEER (1970), fraturas no colo cirúrgico. No grupo controle, foram excluídos indivíduos com ruptura prévia do manguito rotador ou com quaisquer alterações clínicas ou radiológicas (radiografia e ultrassonografia) de afecção no ombro. Para o tratamento cirúrgico foi realizada incisão anterolateral de aproximadamente 10 cm. Durante o procedimento cirúrgico, não foi observada degeneração ou ruptura do tendão supraespal à inspeção macroscópica. Todos os sujeitos do grupo controle estavam fisicamente ativos previamente à fratura.

A tabela 1 demonstra a distribuição entre os pacientes e indivíduos controles. Não houve diferença significativa entre as características clínicas estudadas entre casos e controles ($p > 0,05$).

Tabela 1 - Distribuição das variáveis clínicas de pacientes com ruptura do manguito rotador e indivíduos controles

| Variável | Casos | Controles | Valor de p |
|---|-------------|------------|-------------------|
| Idade durante a cirurgia, anos [mediana (IIQ)] | 56,5 (8) | 59 (26) | 0,79 ^b |
| Gênero (% de homens) | 50% | 62,5% | 0,42 ^c |
| IMC [mediana (IIQ)] | 25,2 (3,28) | 24,6 (4,9) | 0,35 ^b |
| Trabalho (% envolvendo trabalho manual) | 78,9% | 75% | 0,56 ^c |
| Esportes envolvendo membros (% de praticantes) ^d | 7,9% | 0% | 0,56 ^c |
| Tabagismo (% de fumantes) | 15,8% | 25% | 0,91 ^c |
| Número de anos fumando [mediana (IIQ)] | 0,5 (20) | 0 (32,5) | 0,91 ^b |
| Medicação contínua (% de pacientes que usam medicação contínua) | 68,4% | 25% | 0,06 ^c |
| Diabetes (%) | 0% | 0% | - |
| Tireoideopatia (%) | 5,3% | 0% | 0,77 ^c |
| Dislipidemia (%) | 31,6% | 0% | 0,16 ^c |
| Hipertensão (%) | 57,9% | 25% | 0,62 ^c |
| Idade de início, anos [mediana (IIQ)] | 56 (9) | - | - |
| Ombro afetado (% do ombro dominante) | 63,2% | - | - |
| Tempo de sintomas, meses [mediana (IIQ)] | 6 (21) | - | - |
| Tamanho da lesão (% com lesões pequenas a médias) ^a | 76,3% | - | - |
| Tamanho da lesão, cm [mediana (IIQ)] | 2 (1,13) | - | - |
| Desequilíbrio muscular (%) | 39,5% | - | - |
| Atrofia muscular (%) | 31,6% | - | - |

IIQ, intervalo interquartil. ^aTamanho da lesão, de acordo com COFIELD *et al.*; ^bvalor de p por meio do teste Mann-Whitney; ^cvalor de p por meio do teste qui-quadrado; ^dEsportes: Tênis (**n** = 1-2), natação (**n** = 1-2) e não informado (**n** = 1); nenhum dos pacientes eram atletas profissionais; ^eUso de medicação contínua não estava relacionada com a presença de lesões no ombro ou doenças músculo-esqueléticas; medicação contínua incluiu principalmente medicamentos para diabetes, tireopatia, dislipidemia e hipertensão.

* Diferença significativa entre os grupos, **p** < 0,05.

4.2 Amostras de tecido

As amostras de tecido de tendão com ou sem lesão (aproximadamente 2 mm³) foram obtidas de tendões durante o procedimento cirúrgico, conforme descrito acima.

Em pacientes portadores de lesão do manguito rotador, as amostras de tecido representativas dos três setores do manguito rotador de acordo com HABERMEYER *et al.* (1990) foram biopsiadas: manguito central (MC), manguito posterior (MP) e manguito anterior (MA). As amostras de MC (borda da lesão do tendão do supraespinal) representaram o tendão do músculo supraespinal lesionado macroscopicamente e o local mais degenerado da lesão foi escolhido para a realização dessa biópsia. As amostras de MP representaram um tendão sem alteração macroscópica e sem desinserção. As amostras de MA representaram o tendão do músculo subescapular, considerado um tendão normal do manguito rotador. Uma amostra do tendão do músculo supraespinal também foi obtida de indivíduos controles (MC de controles externos, CE).

Espécimes de tecido de 28 pacientes e oito controles foram imediatamente imersos em *Allprotect Tissue Reagent* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e armazenados a - 20°C até a extração de RNA para análise da expressão gênica. Além disso, 30 MC e cinco amostras de tecido do CE foram fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE). As amostras coletadas tanto em *Allprotect* (Qiagen) quanto FFPE estavam disponíveis para análise em 20 (52,6%) casos e 3 (37,5%) controles.

4.3 Análises histológicas, de fibras de colágeno e imuno-histoquímica (IHC)

Todas as amostras de tecidos em FFPE foram coradas com hematoxilina-eosina, para avaliação histológica. A análise histológica quantitativa foi realizada utilizando um sistema de análise digital em um microscópio Olympus BX51, com objetivas acromáticas planas, acopladas a uma câmera de vídeo, Olympus 200, e usando o *software* ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

As amostras de MC foram classificadas de acordo com a presença ou ausência de fissura, alterações degenerativas / necróticas, degeneração mixoide, microcistos, calcificação distrófica e neovascularização. Análise semiquantitativa também foi realizada para degeneração mixoide, microcistos e neovascularização, em que as amostras foram classificadas em quatro grupos diferentes: (i) ausência da característica histológica; (ii) 1 a 25% do tecido apresentando a característica histológica; (iii) 26-50% do tecido apresentando a característica histológica; (iv) característica histológica apresentada em mais de 50% da área do tecido. Para permitir comparação estatística, também classificamos as amostras de MC com base na degeneração mixoide, microcistos e neovascularização em dois grupos principais: (i) < ou = 25% do tecido apresentando a característica histológica; (ii) > 25% do tecido que apresenta a característica histológica.

Hiperplasia sinovial ou de tenócitos, hemorragia com pigmentação de hemossiderina, sinovite crônica e depósitos fibrinoides também foram investigados; no entanto, eles foram observados apenas em uma ou nenhuma das amostras de MC.

As fibras COL1 e COL3 foram avaliadas por meio de coloração com picosirius em 23 amostras de lesão do manguito rotador. As porções coradas com picosirius foram examinadas sob microscopia de luz polarizada (birrefringência) para a presença de COL1 (cores vermelho e amarelo) e COL3 (cor verde). A análise digital foi realizada usando o *software* Image J (National Institutes of Health, EUA).

Cinco campos microscópicos foram examinados por lâmina. É importante destacar que as fibras COL1 e COL3 foram analisadas no mesmo campo microscópico.

Para análise IHQ em amostras lesadas, utilizamos o Dako Autosteiner System (Dako, Carpinteria, CA, EUA). Após a recuperação do epítipo induzida pelo calor com PT-Link-Dako (Dako), as secções de tecido foram incubadas com anticorpos primários contra FN1 (F1, diluição 1:100; Abcam, Cambridge, MA, EUA; n = 27), TNC (EPR4219), diluição 1:50 Abcam; n = 17), TGFB1 (T21, Diluição 1:30; Abcam; n = 10), ou TGFBR1 (policlonal, diluição 1:100; Abcam; n = 19). O sistema de detecção EnVision FLEX (K8000; Dako) foi utilizado para visualização. As amostras foram contrastadas com hematoxilina. As amostras de MC foram classificadas de acordo com a proporção de células imunorreativas: (0) 0% (sem coloração); (i) 25% (expressão fraca); (ii) 26-50% (expressão moderada); (iii) > 50% (expressão forte).

Análises histológicas, de fibras colágenas e IHQ foram realizadas por um patologista que desconhecia os dados clínicos e moleculares.

4.4 Análise da expressão gênica

O RNA total foi extraído de 10 a 20 mg de amostra de tecido utilizando um *kit* comercial AllPrep DNA / RNA / miRNA Mini Kit (Qiagen). A concentração e a qualidade do RNA foram determinadas, utilizando o instrumento Nano-drop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). As amostras de RNA foram armazenadas a - 80 °C.

A expressão gênica foi avaliada por meio da reação em cadeia polimerase quantitativa (em tempo real) via transcriptase reversa (qRT-PCR), de acordo com as Diretrizes de Informação Mínima para Publicação de Experimentos Quantitativos de PCR em Tempo Real (BOOTHANDFORD *et al.*, 2003). O cDNA foi sintetizado a partir de RNA 150 ng, utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

A RT-qPCR foi realizada com 150 ng de cDNA, utilizando o TaqMan Low-Density Array cards (Life Technologies) e o ViiA 7 Real-Time PCR System (Life Technologies). Os genes *HPRT1*, *TBP* e *ACTB* foram selecionados como controles internos para normalizar a amostra, conforme descrito anteriormente por nosso grupo de pesquisa (LEAL *et al.*, 2015).

Todas as reações qRT-PCR foram realizadas em triplicado para todos os genes alvo e genes de referência (Tabela 2). Para cada amostra, os genes alvo e de referência foram analisados simultaneamente para excluir variações técnicas. O método do limiar relativo (método Crt) foi aplicado (LEAL *et al.*, 2015; BELANGERO *et al.*, 2015; BELANGERO *et al.*, 2016; LEAL *et al.*, 2016; LEAL *et al.*, 2017).

Tabela 2 - Resumo dos genes de referência e dos genes-alvos.

| Símbolo do Gene | Nome | Ensaio ^a |
|---------------------------|--|---------------------|
| <i>COL1A1</i> | Colágeno tipo I cadeia alfa 1 | Hs00164004_m1 |
| <i>COL1A2</i> | Colágeno tipo I cadeia alfa 2 | Hs00164099_m1 |
| <i>COL3A1</i> | Colágeno tipo III cadeia alfa 1 | Hs00943809_m1 |
| <i>COL5A1</i> | Colágeno tipo V cadeia alfa 1 | Hs00609088_m1 |
| <i>FNI</i> | Fibronectina 1 | Hs00365052_m1 |
| <i>TNC</i> | Tenascina C | Hs01115665_m1 |
| <i>TGFBI</i> | Fator de transformação do crescimento beta 1 | Hs00998133_m1 |
| <i>TGFBR1</i> | Fator de transformação do crescimento beta, receptor 1 | Hs00610320_m1 |
| <i>GDF5</i> | Fator de crescimento e diferenciação 5 | Hs00167060_m1 |
| <i>ACTB</i> ^b | Beta Actina | Hs01060665_g1 |
| <i>TBP</i> ^b | Proteína ligante da sequência TATA | Hs00427620_m1 |
| <i>HPRT1</i> ^b | Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase | Hs02800695_m1 |

^aAs sondas aTaqMan foram adquiridas como produtos de testes sob demanda para expressão gênica (Life Technologies, USA); ^bGenes de referência para normalização da expressão do gene-alvo.

A expressão dos genes-alvo através das amostras foi calculada usando a equação ΔCrt , na qual [$\Delta\text{Crt} = \text{gene alvo Crt} - \text{a média dos genes de referência Crt}$]. Um valor limite inferior do ciclo (Crt) indica uma expressão gênica mais alta.

As análises moleculares foram realizadas por um examinador cego durante os experimentos para os dados clínicos, histológicos e de IHQ.

4.5 Análise estatística

A quantificação das fibras de colágeno não apresentou distribuição normal. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar variáveis clínicas e histológicas, quantificação de fibras colágenas e expressão proteica. Estes dados são mostrados como frequência da mediana e IIQ. Utilizou-se o teste qui-quadrado para comparar variáveis clínicas e histológicas entre casos e controles, e para comparar a frequência de variáveis histológicas entre subgrupos clínicos de pacientes.

Os dados de expressão gênica apresentaram distribuição normal. O teste do modelo linear generalizado (MLG) foi aplicado para comparar os níveis de expressão de mRNA entre casos e controles, assim como variáveis clínicas e histológicas. O MLG para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni, foram realizados para comparar a expressão gênica entre amostras de tendões pareados de pacientes com manguito rotador. Esses dados são mostrados como a média e desvio-padrão (DP). O teste T de Student para amostras independentes foi usado para comparar a idade entre casos e controles.

A correlação de Spearman foi usada para investigar possíveis correlações entre fibras colágenas ou dados quantitativos de expressão e clínicos, tais como idade na cirurgia, duração dos sintomas, extensão da lesão e número de anos de tabagismo.

O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para a análise, sendo alfa ajustado quando necessário (correções de Bonferroni).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

A idade e o tamanho da lesão foram diretamente correlacionados ($p = 0,035$; $\rho = 0,322$) (Figura 4).

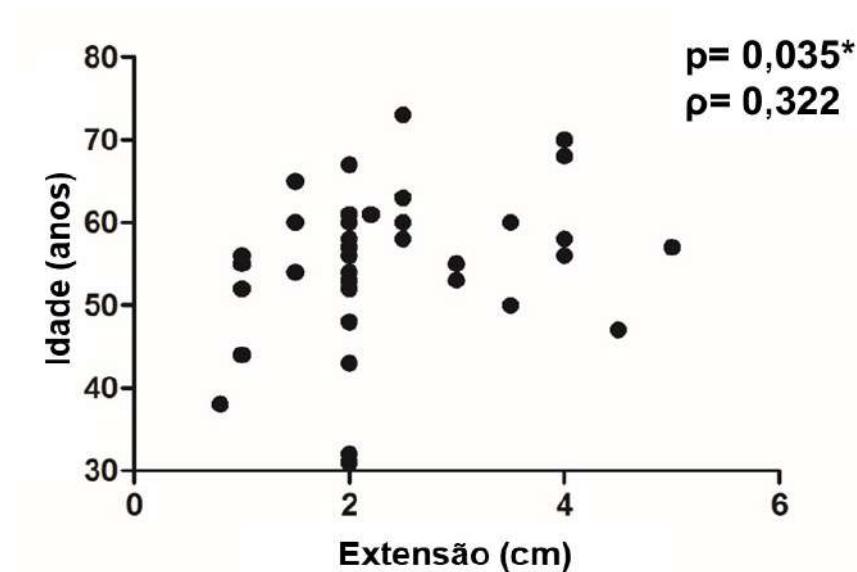


Figura 4 - Correlação entre a idade dos pacientes e o tamanho das lesões do manguito rotador

Coeficientes de correlação e valor p do teste de correlação de Spearman estão demonstrados. $*p < 0,05$, significante correlação pelo teste de correlação de Spearman.

Fissuras, alterações degenerativas/necróticas, degeneração mixoide, microcistos e neovascularização foram os principais achados histológicos em amostras de tendão supraespinal lesionado (Tabela 3, Figura 5). A Figura 5 demonstra a porcentagem de células com degeneração mixoide, microcistos e neovascularização em amostras de lesão do manguito rotador.

No grupo CE, a degeneração mixoide foi observada em apenas uma amostra (20%) e esteve presente em menos de 25% da área do tecido. A neovascularização também foi detectada em duas amostras (40%) de CE, mas em menos de 25% das células. O número de amostras FFPE no grupo CE foi limitado; no entanto, observamos um aumento significativo na frequência de degeneração mixoide nas amostras de tendão lesado ($p < 0,001$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição das variáveis histológicas entre pacientes com lesão do manguito rotador e controles

| Variável | Casos | Controles | Valor de p ^a |
|--|-------|-----------|-------------------------|
| Fissura (%) | 10% | 0% | 0,62 |
| Alterações degenerativas/necróticas(%) | 16,7% | 0% | 0,44 |
| Degeneração mixoide(%) | 83,3% | 20% | 0,01* |
| Microcistos (%) | 36,7% | 0% | 0,13 |
| Calcificação distrófica (%) | 0% | 0% | - |
| Neovascularização (%) | 23,3% | 40% | 0,38 |

^a Valor de p pelo teste Qui-quadrado; * Diferença significativa entre grupos.

As fibras de COL1 foram encontradas mais frequentemente do que as fibras de COL3 nas amostras MC (Figura 5). Não foi verificada correlação entre a quantidade de COL1 e a COL3 ($p = 0,790$; $\rho = 0,059$).

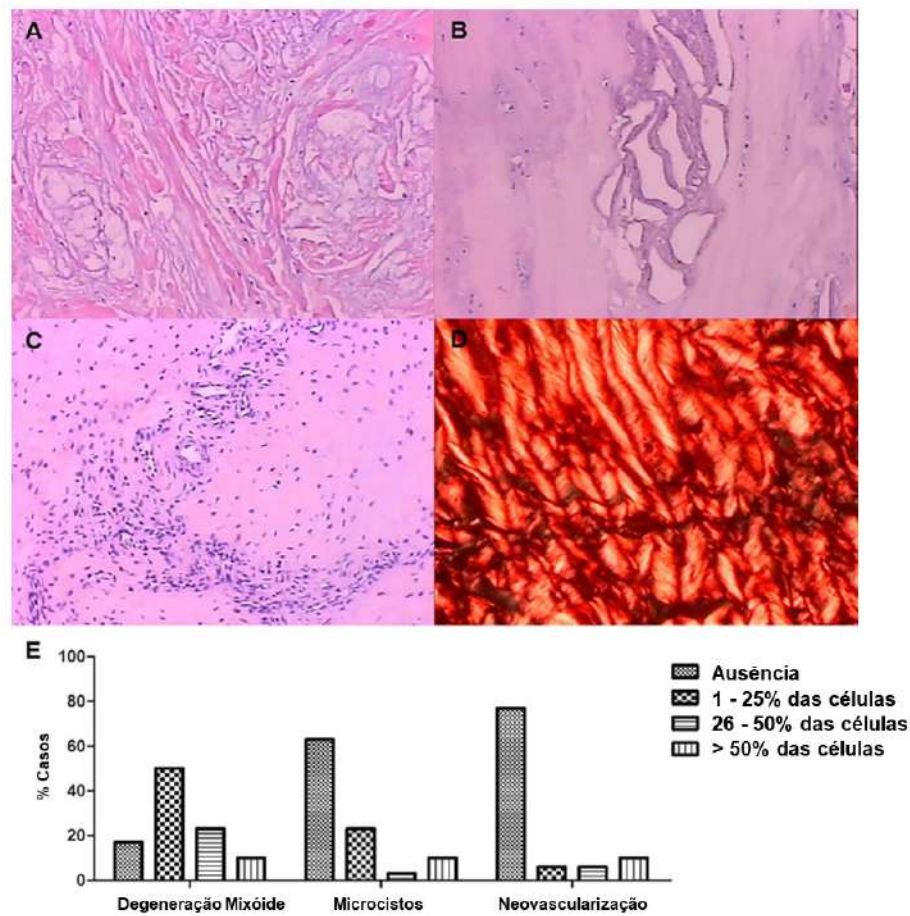


Figura 5 - Características histológicas dos tendões do supraespinal dos pacientes com lesão do manguito rotador

(A) Degeneração mixoide; (B) Microcistos; (C) Neovascularização; (D) Fibras COL1 (cores amarelas e vermelhas) e Fibras COL3 (cor verde); (E) Porcentagem de células com os achados histológicos.

5.1 Expressão de mRNA e proteína em amostras de tendão: comparação entre casos e controles externos

A expressão dos genes *COL1A2* (- 5,3 vs. - 4,3; $p = 0,049$), *COL5A1* (- 3,0 vs. - 5,2; $p = 0,001$), *FNI* (-7,0 vs. -5,0; $p = 0,002$), *TNC* (-4,2 vs. 2,5; $p = 0,005$) e *TGFBR1* (0,6 vs. 1,3; $p = 0,022$) foi aumentada nas amostras de tendão supraespinal dos casos, em comparação com os controles (Figura 6).

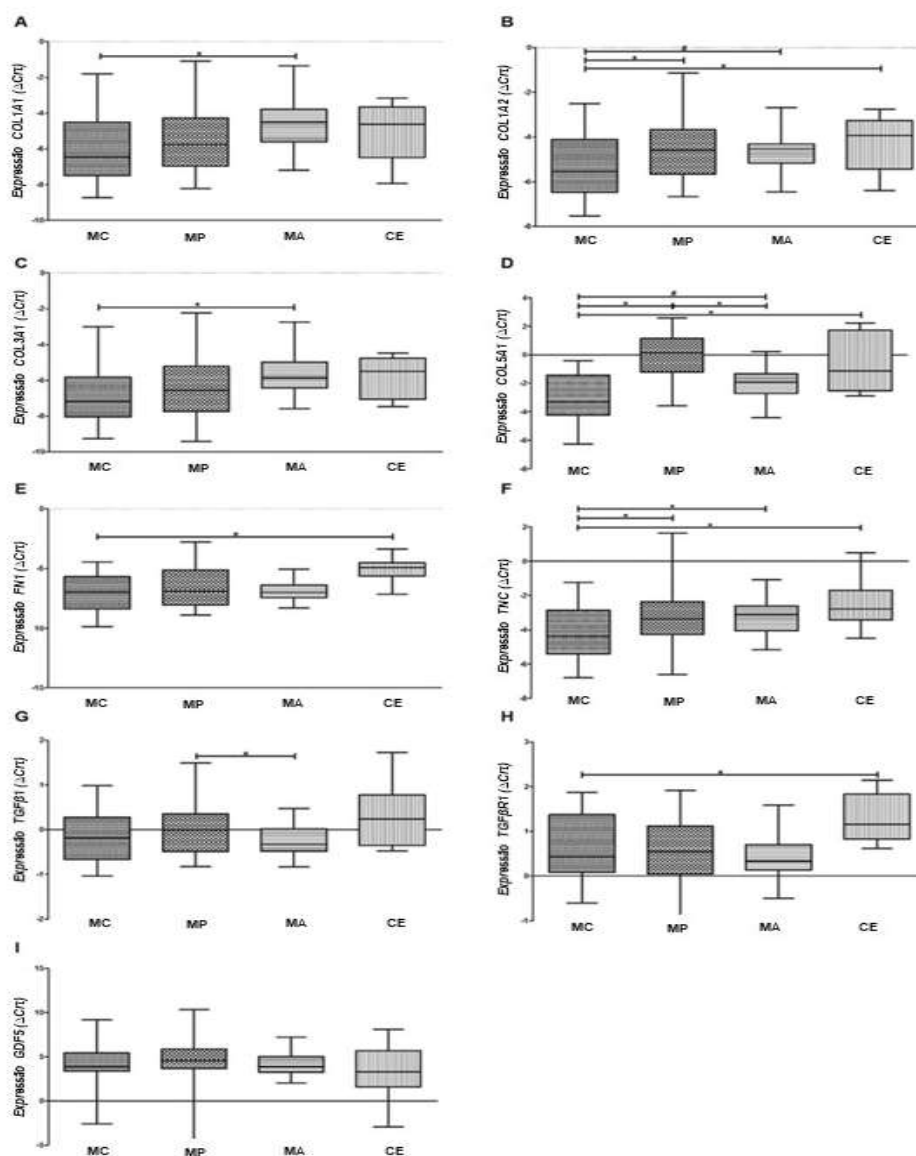


Figura 6 - Expressão gênica em amostras de tendão de indivíduos com e sem lesão do manguito rotador

(A) *COL1A1*; (B) *COL1A2*; (C) *COL3A1*; (D) *COL5A1*; (E) *FNI*; (F) *TNC*; (G) *TGFBI*; (H) *TGFBR1*; (I) *GDF5*. Um valor limite inferior do ciclo delta (ΔCt) indica maior expressão gênica. Os traços horizontais representam os valores mínimo e máximo. **MC**: manguito central (borda supraespinal lesionada); **MP**: manguito posterior, que representa uma amostra do tendão supraespinal sem alteração macroscópica de desinserção; **MA**: manguito anterior (tendão subescapular); **CE**: controle externo, representando amostras de tendão de pacientes sem ruptura do manguito rotador. Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) pelo teste MLG para comparações entre casos e controles, ou por MLG para medidas repetidas seguidas pelo teste de Bonferroni, para comparações, envolvendo amostras múltiplas de pacientes com ruptura do manguito rotador. # Tendência à significância ($p = 0,053$; valor-p ajustado).

A maioria das amostras de lesão exibiu imunorreatividade de FN1, TNC e TGFB1. A ausência de imunocoloração de FN1 foi observada apenas em duas amostras de lesão (7,4%) (Figura 7A). A imunorreatividade de FN1 foi fraca em nove (33,3%), moderada em sete (25,9%) e forte em nove (33,3%) das amostras de MC (Figuras 7A e B). A maioria das amostras MC apresentou forte imunorreatividade de TNC (Figuras 7C e D).

Uma forte imunorreatividade de TGFB1 também foi detectada em oito (80%) das amostras de MC (Figuras 7 E e F). Por outro lado, o padrão de imunorreatividade do TGFBR1 foi mais heterogêneo. A ausência de imunorreatividade de TGFBR1 foi observada em 12 amostras (63,2%) de MC, e apenas uma amostra (5,3%) de lesão apresentou expressão forte de proteínas (Figuras 7G e H).

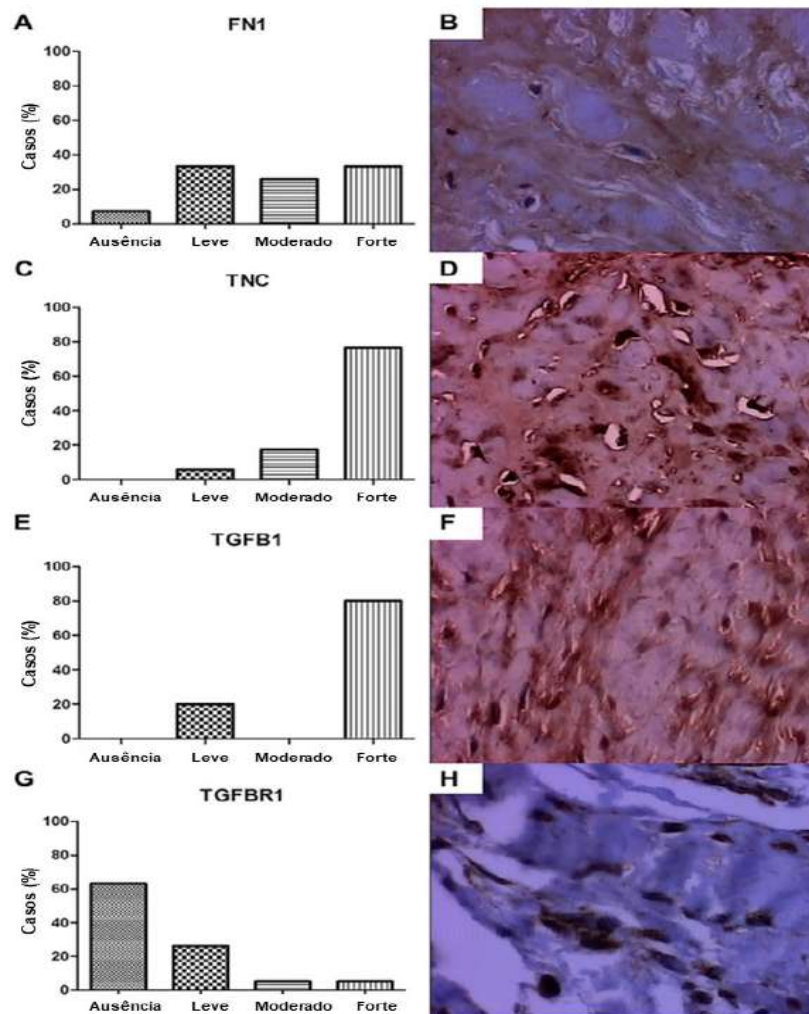


Figura 7 - Imunoreatividade proteica em amostras de tendão de indivíduos com lesão do manguito rotador (A) Distribuição da imunorreatividade à FN1, de acordo com a proporção de células imunorreativas. (B) Amostra de tendão lesionado, exibindo imunorreatividade à FN1. (C) Distribuição da imunorreatividade da TNC, de acordo com a proporção de células imunorreativas. (D) Amostra de tendão lesionada, exibindo imunorreatividade de TNC. (E) Distribuição da imunorreatividade do TGFB1, de acordo com a proporção de células imunorreativas. (F) Amostra de tendão lesada, exibindo imunoreatividade para TGFB1 (G) Distribuição da imunorreatividade de TGFBR1, de acordo com a proporção de células imunorreativas. (H) Amostra de tendão lesionado, exibindo imunorreatividade de TGFBR1.

Foi também detectada uma correlação direta entre a expressão da proteína FN1 e do mRNA ($p = 0,025$, $\rho = - 0,526$; sendo que uma ΔCrt baixa

indica uma expressão gênica mais elevada). Além disso, a proporção de fibras COL1 / COL3 foi diretamente correlacionada com a expressão de mRNA de *COL1A1* / *COL3A1* ($p = 0,033$, $\rho = - 0,535$).

A expressão proteica de GDF5 não foi avaliada nas amostras de tendão, já que não detectamos diferença significativa nos níveis de mRNA de *GDF5* entre os tendões lesados e não lesados. Além disso, não observamos associação entre a expressão de mRNA e variáveis clínicas ou histológicas.

5.2 Expressão alterada de mRNA em diferentes amostras de tendão de pacientes com lesões do manguito rotador

As expressões de *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *TNC* e *TGFBI* diferiram entre as amostras de tendão de indivíduos com lesão do manguito rotador (Figura 6).

A expressão de *COL1A2* (- 5,3 versus - 4,5; $p = 0,007$), *COL5A1* (- 3,0 vs. - 0,9; $p < 0,001$) e *TNC* (- 4,2 vs. - 3,1; $p = 0,008$) foi mais elevada em amostras de MC em relação às amostras de MP.

As amostras de MC apresentaram maior expressão de *COL1A1* (-6,0 vs. -4,6; $p = 0,001$), *COL3A1* (- 6,9 vs. - 5,7; $p = 0,001$) e *TNC* (- 4,2 vs. - 3,3; $p = 0,04$), em comparação às amostras de MA.

A expressão de *COL1A2* (- 5,3 vs. - 4,7) e *COL5A1* (-3,0 vs. -2,0) também foi mais alta nas amostras de MC do que nas de MA ($p = 0,053$, para ambas as comparações). A expressão de *COL5A1* (- 0,1 vs. - 2,0; $p < 0,001$) foi reduzida e a expressão de *TGFBI* (- 0,1 vs. - 0,3; $p = 0,030$) foi aumentada nas amostras de MP em relação às amostras de MA.

5.3 Alteração da expressão gênica e proteica em achados histológicos associados a lesões dos tendões do manguito rotador

Amostras MC com fissuras exibiram quantidades aumentadas de COL3 e proporção reduzida da razão de fibras de COL1 e COL3 (11,4 vs. 6,6; $p = 0,035$; 21,57 vs. 37,4; $p = 0,046$, respectivamente; Figuras 8A e B).

Amostras de MC com microcistos em mais de 25% da área do tecido apresentaram aumento da expressão de *COL5A1* (-5,1 vs. -2,8; $p = 0,014$) (Figura 8C), *FNI* (-8,9 vs. -6,9; $p = 0,044$) (Figura 8E) e *TNC* (-6,1 vs. -4,2; $p = 0,020$) (Figura 8G), em relação às amostras com microcistos em $\leq 25\%$ do tecido. Além disso, amostras de MC com microcistos exibiram maior expressão de *TNC* em comparação àquelas sem essa característica histológica (-4,1 vs. -5,2; $p = 0,046$) (Figura 8H). Uma tendência para uma maior expressão foi também observada para *COL5A1* (-4,0 vs. -2,6; $p = 0,05$) (Figura 8D) e *FNI* (-8,1 vs. -6,7; $p = 0,054$) (Figura 8F) em amostras com microcistos.

Níveis mais baixos de *FNI* foram detectados em amostras de MC apresentando um processo de neovascularização (-6,2 vs. -7,8; $p = 0,035$) (Figura 8I). A expressão de *TNC* também tendeu a ser mais baixa em amostras com neovascularização (-3,6 vs. -4,9; $p = 0,051$) (Figura 8J). A expressão da proteína TGFBR1 foi associada à presença de neovascularização (1 vs. 0; $p = 0,034$) (Figura 8K). No entanto, no subconjunto de amostras em que a imunorreatividade de TGFBR1 foi avaliada, apenas três amostras exibiram neovascularização.

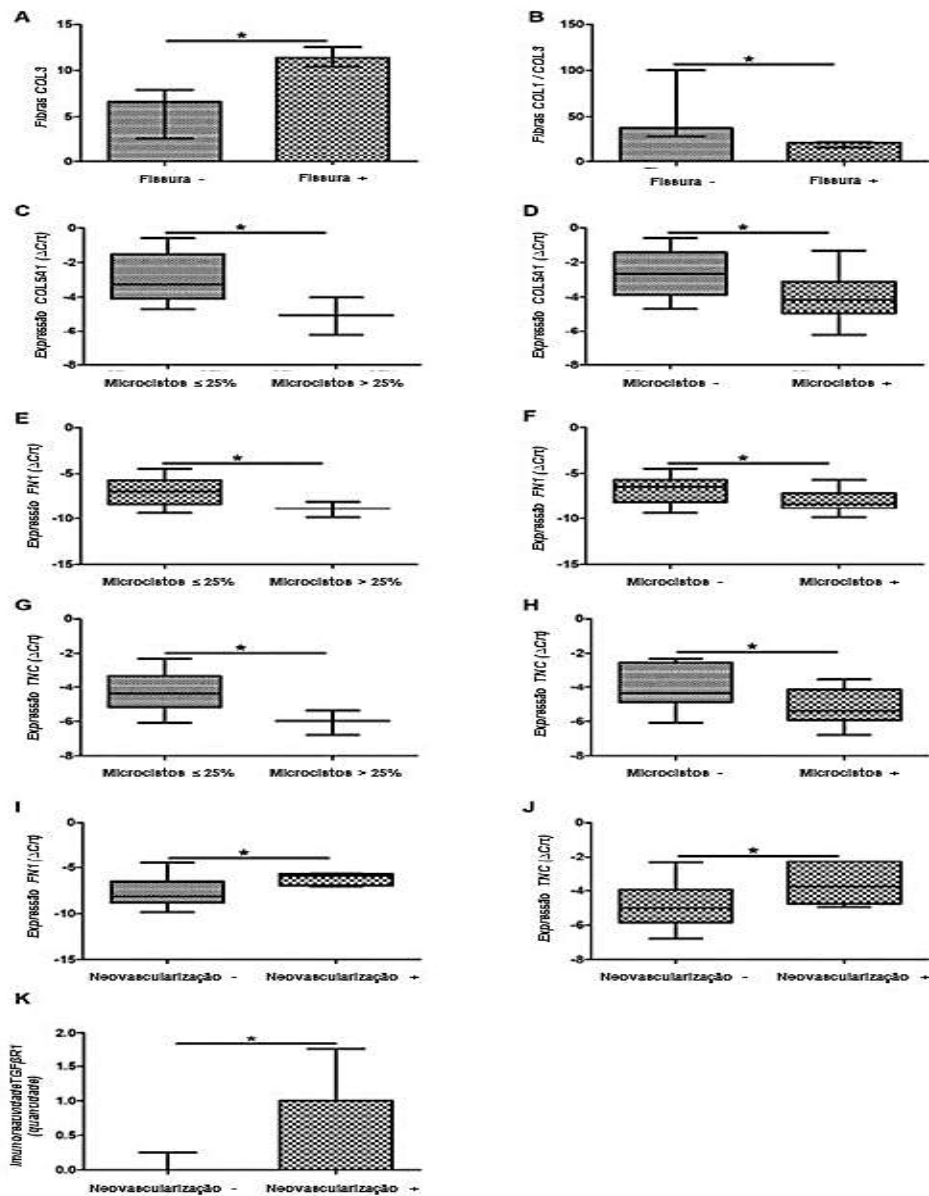


Figura 8 - Características histológicas e expressão gênica

Amostras de tecido do tendão supraespinal com fissuras tiveram quantidade aumentada de fibras colágenas tipo III (A) e menor proporção das fibras COL1 / COL3 (B). Os microcistos foram associados com expressão aumentada de mRNA de *COL5A1* (C e D), *FN1* (E e F) e *TNC* (G e H). A expressão de mRNA de *FN1* (I) e *TNC* (H) foi reduzida nas amostras que apresentaram neovascularização. A maior imunoreatividade do TGFBR1 (I) foi detectada em amostras com neovascularização. Nos gráficos de diagrama de caixa, os traços horizontais representam os valores mínimo e máximo. Um valor limite inferior do ciclo delta (Δ Crt) indica maior expressão gênica. COL1, colágeno tipo I; COL3, colágeno tipo III. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

5.4 O efeito clínico nos resultados

A quantidade de fibras COL3 foi inversamente correlacionada com a duração da lesão ($p = 0,039$; $\rho = 0,434$) (Figura 9A). Além disso, a razão de expressão das proteínas das fibras COL1 / COL3 ($p = 0,032$; $\rho = 0,0447$) (Figura 9B), bem como a expressão de FN1 ($p = 0,031$; $\rho = 0,417$) (Figura 9C) foram diretamente correlacionadas com a duração dos sintomas.

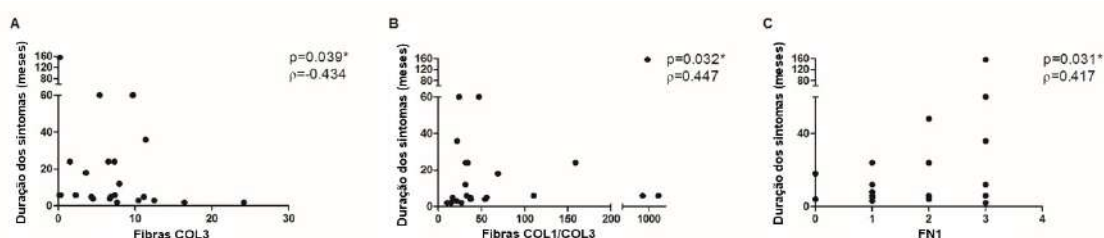


Figura 9 - Efeito da duração dos sintomas: quantificação de fibras COL3 (A), relação COL1 / COL3 (B) e imunorreatividade à FN1 (C) Coeficientes de correlação e valores de p do teste de correlação de Spearman são mostrados. * $p < 0,05$, correlação significativa pelo teste de correlação de Spearman.

Tabagistas exibiram maior frequência de microcistos (80% vs. 0%; $p < 0,001$) (Figura 10A) e degeneração mixoide (83% vs. 20,8%; $p = 0,009$) (Figura 10B) em mais de 25% da área de tecido avaliada, quando comparados com não fumantes.

Amostras de MC de pacientes com maior número de anos de tabagismo (incluindo ex-fumantes) apresentaram maior frequência de microcistos em > 25% da área do tecido (22,5 vs. 0; $p = 0,026$) (Figura 10C). Expressão aumentada de *COL5A1* (- 5,2 vs. - 2,7; $p = 0,011$), *FN1* (- 8,9 vs. - 6,8; $p = 0,021$), e *TNC* (- 6,0 vs. - 4,2; $p = 0,014$) foi detectada nas amostras de tecido MC de fumantes, em relação aos não fumantes (Figura 10D-F). Além disso, observou-se uma correlação direta entre a expressão de *TGFBI*

e o número de anos de tabagismo ($p = 0,042$; $\rho = 0,387$) (Figura 10G). A expressão da proteína FN1 também foi diretamente correlacionada com o número de anos de tabagismo ($p = 0,048$; $\rho = 0,384$) (Figura 10H).

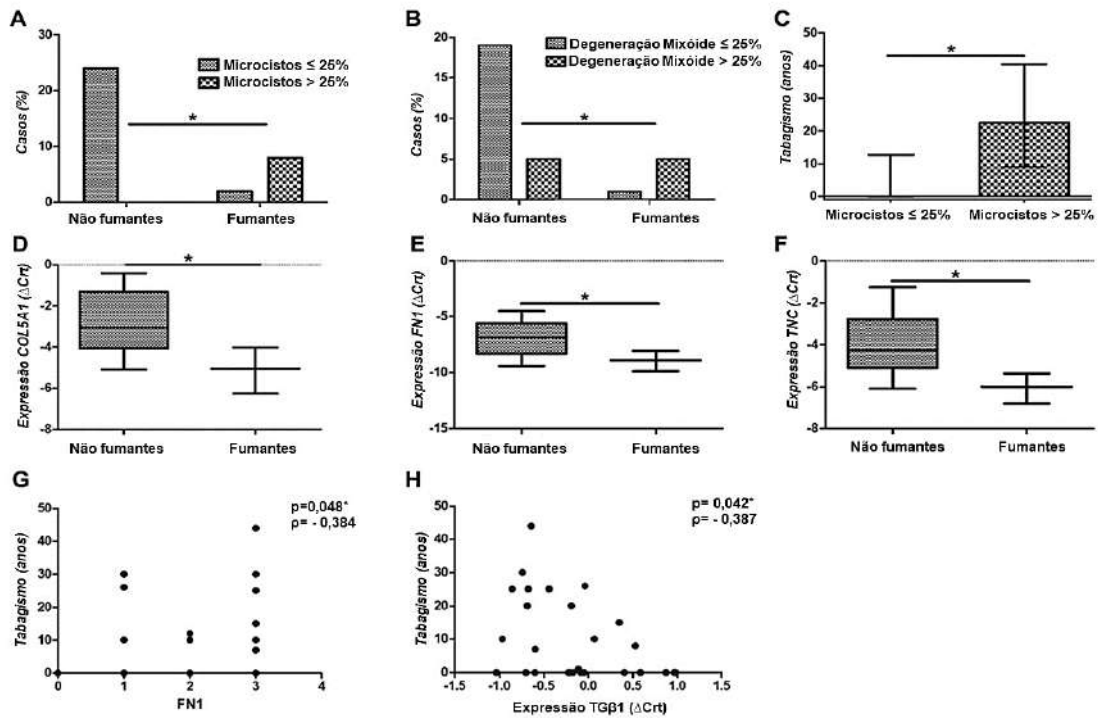


Figura 10 - Efeito do tabagismo na MEC de amostras de tendão de indivíduos com lesão do manguito rotador

Os fumantes apresentaram maior frequência de microcistos (A) e degeneração mixoide (B) em mais de 25% do tecido pelo teste do qui-quadrado (A). A frequência de microcistos (C) parece aumentar com o tabagismo prolongado, como evidenciado pelo teste de Mann-Whitney (mediana e intervalo interquartil é mostrado). Os fumantes também exibiram expressão aumentada de mRNA de *COL5A1* (D), *FN1* (E) e *TNC* (F) no tecido lesionado pelo teste MLG (os traços horizontais representam os valores mínimo e máximo). A imunorreatividade da FN1 (G) e a expressão do mRNA do *TGFβ1* (H) em amostras de tecido lesionado de pacientes com ruptura do manguito rotador correlacionaram-se diretamente com o número de anos de tabagismo, calculado pelo teste de correlação de Spearman. Coeficientes de correlação e valores-p do teste de correlação são mostrados. Um valor limite do ciclo delta inferior (ΔCrt) indica maior expressão gênica; $*p < 0,05$.

Expressões aumentadas de *COL1A2* (- 6,2 vs. 4,9; $p = 0,023$), *COL3A1* (- 7,8 vs. - 6,5; $p = 0,040$), *COL5A1* (- 4,2 vs. - 2,5; $p = 0,009$), *FN1* (- 8,1 vs. - 6,6; $p = 0,018$), *TGFβ1* (- 0,65 vs. 0,05; $p = 0,003$), e *TGFβR1* (0,07 vs.

0,85; $p = 0,006$) foram observadas em amostras de MC de pacientes sem o ombro dominante afetado (Figura 11). Por outro lado, a expressão da proteína TGFBR1 foi aumentada em amostras de pacientes com o ombro dominante afetado ($p = 0,003$). A expressão de TGFBR1 não foi observada em nenhuma das amostras de pacientes com o ombro não dominante afetado.

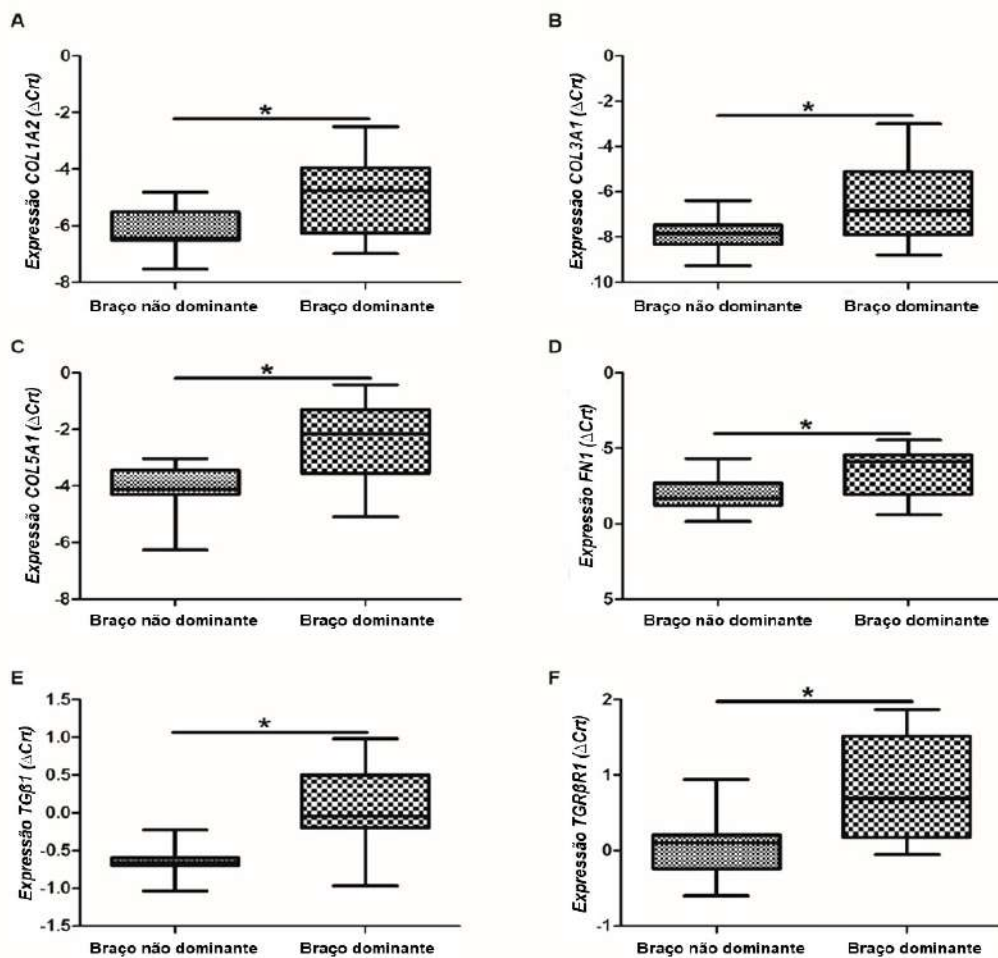


Figura 11 - Amostras de tecido do tendão do supraespinal de pacientes com ruptura do manguito rotador no ombro não dominante

Apresentaram aumento da expressão de mRNA de *COL1A2* (A), *COL3A1* (B), *COL5A1* (C), *FN1* (D), *TGFβ1* (E) e *TGFβR1* (F). Um valor limite inferior do ciclo delta (Δ Crt) indica maior expressão gênica. Os traços horizontais representam os valores mínimo e máximo. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) pelo teste MLG.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A etiologia exata das lesões do manguito rotador permanece desconhecida. Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos podem levar a modificações da estrutura dos tendões do ombro – principalmente compostos por proteínas da MEC – e às rupturas de espessura total.

A elucidação da biologia por trás dessa complexa doença, por meio de análises histológicas, de genes e proteínas, pode ajudar a desenvolver novas opções terapêuticas, complementares à cirurgia, e contribuir para a compreensão da heterogeneidade do paciente, com impacto na determinação do prognóstico e melhor tratamento.

As alterações degenerativas são importantes para a gênese da ruptura do manguito rotador. Usando dados de um grande ensaio clínico randomizado, RASHID *et al.* (2017) relataram que o aumento da idade e o tamanho da lesão são fatores de risco para falha na cicatrização do reparo do manguito rotador. No presente estudo, descrevemos uma relação direta entre a idade e o tamanho da lesão na população estudada. Dessa forma, nossos resultados reforçam que o envelhecimento contribui como um fator intrínseco envolvido na degeneração tendínea. Além disso, nossa amostra parece espelhar a descrição de um grande conjunto de amostras clínicas e, portanto, é representativa para o estudo de alterações moleculares envolvidas na etiologia da lesão.

Nossos resultados também mostraram que os principais achados nos tendões rompidos incluem fissuras, alterações degenerativas / necróticas, alteração mixoide e microcistos, confirmando a presença de fibrilas colágenas anormais, bem como o processo de degeneração descrito na

literatura (LONGO *et al.*, 2008; DEAN *et al.*, 2012; VARITIMIDIS *et al.*, 2016). Essas alterações degenerativas no tendão podem contribuir para a alta taxa de recorrência após a cirurgia.

É amplamente sabido que as rupturas crônicas do manguito rotador têm um potencial de cura limitado e um alto risco de recorrência, mesmo se tratadas cirurgicamente (CHILLEMI *et al.*, 2011). Em nossa série não foi possível avaliar o efeito dos achados histológicos na recorrência do manguito rotador. Nosso estudo incluiu apenas a avaliação de um único momento (no momento do reparo cirúrgico), pois o acesso a múltiplas biópsias de pacientes após a cirurgia sem uma necessidade clínica não seria eticamente aprovado.

Nós também detectamos neovascularização em um subconjunto de amostras de tendão. O aumento da vascularização ou proliferação vascular na ruptura do tendínea já foi descrito anteriormente (LONGO *et al.*, 2008; VARITIMIDIS *et al.*, 2016). Lewis *et al.* (2009) demonstraram que a neovascularização ocorre em indivíduos com diagnóstico clínico de tendinopatia do manguito rotador e, em menor extensão, em ombros assintomáticos. Curiosamente, embora calcificações tenham sido relatadas em até 24,7% das rupturas do manguito rotador, (GOUTALLIER *et al.*, 2005; VARITIMIDIS *et al.*, 2016) não detectamos essa variação histológica em nossas amostras.

Apesar de alguns achados histológicos estarem associados ao processo de degeneração, nossos resultados sugerem que a lesão do manguito rotador apresenta potencial de reparo intrínseco. Detectamos aumento da expressão dos genes *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *FNI*, *TNC*, *TGFB1* e *TGFBRI* nessa afecção. A expressão aumentada dos genes de colágeno, *FNI* e *TNC*, é consistente com nossa investigação anterior, na qual demonstramos

uma redução na expressão de metaloproteinases - um grande grupo de enzimas proteolíticas responsáveis pela remodelação e degradação tecidual da MEC - e o aumento da expressão de seus genes inibidores (*TIMP*) na mesma coorte de ruptura do manguito rotador (LEAL *et al.*, 2017). Além disso, o aumento da expressão de *COL5A1*, *FNI* e *TNC* nos tendões foi mais evidente nas lesões com maior frequência de um achado histológico de degeneração, como os microcistos. Esses achados podem estar relacionados à tentativa de sintetizar e reunir novas fibras de colágeno no tecido degenerado.

As amostras de tendão lesionado apresentaram expressão aumentada de *COL1A1*, *COL1A2* e *COL3A1*, em comparação com os tendões não lesados. Nossos resultados corroboram estudos anteriores que usaram um conjunto de amostras de cadáveres como controles (LO *et al.*, 2005; SHIRACHI *et al.*, 2011). O COL1 é a proteína mais presente nos tendões e é responsável pela resistência do tendão às cargas fisiológicas. Por outro lado, o COL3, com sua capacidade de realizar ligações cruzadas (crosslink), modula o crescimento do diâmetro dessas fibras de colágeno (BIRK *et al.*, 1997). Durante a cicatrização do tendão, as fibras de COL3 atuam na fase inicial de reparo, sendo posteriormente infiltradas e substituídas por COL1 (ROBERTTSON *et al.*, 2012).

Expressão aumentada de *COL1A1*, *COL1A2* e *COL3A1* foi observada em tendões lesionados; no entanto, amostras de lesão com fissuras exibiram níveis aumentados de fibras de COL3 e uma menor proporção de fibras de COL1 / COL3. Esses achados corroboram com a percepção de que o aumento dos níveis desses colágenos pode estar envolvido na tentativa de cicatrização tecidual, como descrito anteriormente. Por outro lado, um

aumento nas fibras de COL3 é observado principalmente em um tendão adulto rompido.

Uma maior proporção de fibras de COL1 do que as fibras de COL3, bem como o aumento da expressão de FN1, foi detectada durante a progressão da doença (aumento do tempo de duração dos sintomas ou atraso no tratamento cirúrgico). Embora nossos resultados estejam de acordo com a hipótese de que a proporção aumentada de COL1/ COL3 possa ser indicativa da resposta de reparo, nossos achados clínicos mostram que a razão de COL1/ COL3 não pode ser usada como um único marcador de reparo total, como previamente postulado (ROBERTTSON *et al.*, 2012).

Nossas observações clínicas indicam que a tentativa intrínseca de reparo do tendão é insuficiente para restabelecer a integridade do tecido, e o tratamento cirúrgico é necessário, mesmo em pacientes que passaram por um maior período de doença, o que concorda com YAMAMOTO *et al.* (2017), em estudo que foi demonstrado clinicamente a ausência de cicatrização e o aumento do tamanho da lesão em cerca de 47% das rupturas do manguito rotador.

O aumento da expressão de *COL5A1* foi um dos principais achados no tendão roto e degenerado. A quantidade de colágeno tipo V é relativamente pequena em relação à do COL1 nos tecidos articulares (BIRK *et al.*, 2001). O colágeno tipo V forma fibrilas heterotípicas com COL1 e desempenha um papel central na regulação da fibrilogênese. WENSTRUP *et al.* (2006) demonstraram que a regulação negativa da expressão de *COL5A1* leva a uma redução no número de fibrilas em modelos de ratos. Assim, o aumento da expressão de *COL5A1* sugere que o processo de fibrilogênese pode estar ocorrendo na borda do tendão roto como parte da resposta de reparo observada no nível molecularmente.

Ambas as expressões de mRNA de *FNI* e *TNC* foram aumentadas em amostras de tendões rotos, como demonstrado anteriormente em estudos de proteínas por RILEY *et al.* (1996) e TILLANDER *et al.* (2002), em um pequeno conjunto de amostras. Esses genes codificam glicoproteínas que atuam na diferenciação tenogênica (LUI *et al.*, 2011) e, portanto, no processo de cicatrização, promovendo a migração e adesão de fibroblastos às fibrilas (FLUCK *et al.*, 2008; GIBLIN *et al.*, 2015). Estão envolvidos na regulação da associação das fibrilas de colágeno (TILLANDER *et al.*, 2002), bem como na regulação do *TGFBI* (DALLAS *et al.*, 2015; FLUCK *et al.*, 2008). Especialmente para *TNC*, um aumento contínuo na expressão do gene e proteína foi detectado do tendão normal para a borda do tendão rompido (CE < MA < MP < MC). Essa tendência também é observada na análise da expressão gênica de colágeno em nossas amostras, o que corrobora com a função de *TNC* e *FNI* na diferenciação tenogênica. Portanto, nossos achados sugerem que *FNI* e *TNC* podem ser os principais impulsionadores dos eventos moleculares que ocorrem nos tendões do ombro de pacientes com rupturas do manguito rotador de espessura total e podem ser alvo de novos tratamentos que tentem estimular a cicatrização do tendão provavelmente em combinação com o procedimento cirúrgico.

Embora tenhamos detectado uma expressão aumentada de *TGFBR1* em amostras de tendão supraespinal lesionado em comparação com controles, não foi detectada a expressão proteica de TGFBR1 na maioria das amostras de lesão. O gene *TGFBR1* codifica o receptor serina / treonina quinase para o *TGFBI* e é um propagador central da sinalização do *TGFBI* (MOORE-SMITH *et al.*, 2011), que está envolvido em diversos processos biológicos, incluindo o controle dos processos de proliferação celular, diferenciação e inflamação (ATTISANO *et al.*, 2002). O TGFBR1 medeia a

indução de múltiplos genes envolvidos nas interações célula-matriz necessárias para esses processos biológicos (EBNER *et al.*, 1993), como os aqui estudados. Vale ressaltar que os estudos de biologia molecular demonstraram um fenótipo inflamatório em várias doenças tendíneas, incluindo rupturas do manguito rotador, apesar da ausência de sinais clínicos de “inflamação” (MILLAR *et al.*, 2017).

Por outro lado, os resultados deste estudo não corroboram as conclusões de um estudo anterior no qual o mRNA do *TGFBR1* estava diminuído no manguito rotador doente em comparação com tendões isquiotibiais saudáveis (GOODIER *et al.*, 2016). No referido trabalho, amostras de tendão (n = 5) de uma articulação diferente foram utilizadas como controle, contribuindo para os achados divergentes. Mais investigações são necessárias para entender a regulação pós-transcricional do *TGFBR1* e seu papel nas rupturas tendíneas. Nossa hipótese é que o aumento da expressão do *TGFBR1* pode contribuir para a ativação da via *TGFBI* e pode ser um fator-chave na tentativa de reparar os tendões. Entretanto, devido à função pleiotrópica do *TGFBI*, essa via deve ser dinâmica e estritamente regulada nos tendões, o que é um desafio para uma terapia-alvo.

O efeito do tabagismo no desenvolvimento e na resposta de reparo às rupturas do manguito rotador ainda é controverso. Entretanto, em uma revisão sistemática, BISHOP *et al.* (2015) concluíram que o fumo pode acelerar a degeneração do manguito rotador e aumentar a prevalência de rupturas maiores do manguito rotador. Observamos que os fumantes exibiram alta frequência de sinais histológicos de processos degenerativos na borda do tendão supraespinal, provavelmente acompanhados pela modulação da expressão de *COL5A1*, *FNI*, *TNC* e *TGFBI*. Assim, nosso

estudo reforça, por meio da análise histológica e molecular, que o tabagismo contribui para a indução de um processo degenerativo em tendões que culminam com rupturas teciduais.

Também detectamos aumento da MEC, aumento da expressão de mRNA de membros da família *TGFB* e redução do *TGFBR1* em amostras de lesão do ombro não dominante, em comparação com aquelas do ombro dominante. Hipotetizamos que o uso excessivo do ombro pode contribuir para inflamação e degeneração contínuas nos tendões do braço dominante, sem permitir modulações moleculares dinâmicas detectáveis durante a tentativa de reparo tecidual.

Entre as limitações do estudo, devemos mencionar que resultados falso-negativos podem ter ocorrido, pois algumas análises estatísticas exibiram um poder reduzido para detectar diferenças significativas entre os grupos. Embora tenhamos investigado um grande conjunto de amostras de lesão e controle (não cadáveres) em relação a estudos moleculares anteriores (LO *et al.*, 2005; SHIRACHI *et al.*, 2011; GOTOH *et al.*, 2013), há um alto grau de heterogeneidade clínica entre os pacientes com ruptura do manguito rotador. É importante ressaltar que, para obter um resultado biológico significativo, avaliamos não apenas a expressão da proteína, mas também a expressão do RNA, usando uma abordagem altamente sensível e aplicando uma normalização adequada (LEAL *et al.*, 2015).

Por apresentar um desenho de corte transversal, o presente estudo não nos permite identificar se o perfil de expressão gênica encontrado é causa ou efeito da doença. Entretanto, podemos inferir que os genes diferentemente expressos nos tendões do manguito rotador apontam o seu envolvimento e a sua relevância para a fisiopatologia da doença.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

1. A expressão alterada dos genes *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *FNI*, *TNC*, *TGFBI*, e *TGFBR1* está envolvida no processo de degeneração nas rupturas do manguito rotador.
2. A relação reduzida de fibras COL1 / COL3 e a expressão aumentada de *COL5A1*, *FNI* e *TNC* foram detectadas em lesões com maior frequência de alterações degenerativas.
3. Níveis reduzidos de *FNI* e *TNC* contribuíram para o processo de neovascularização.
4. Variáveis clínicas como tempo de lesão, dominância e tabagismo interferem no processo degenerativo dos tendões.

REFERÊNCIAS

3 REFERÊNCIAS

Ahn JO, Chung JY, Kim DH, Im W, Kim SH. Differences of RNA Expression in the Tendon According to Anatomic Outcomes in Rotator Cuff Repair. *Am J Sports Med.* 2017 Nov;45(13):2995-3003.

Altinisik J, Meric G, Erduran M, Ates O, Ulusal AE, Akseki D. The BstUI and DpnII variants of the *COL5A1* gene are associated with tennis elbow. *Am J Sports Med.* 2015;43:1784-9.

Arce G, Bak K, Bain G, Calvo E, Ejnisman B, Di Giacomo G, *et al.* Management of disorders of the rotator cuff: proceedings of the ISAKOS upper extremity committee consensus meeting. *Arthroscopy.* 2013 Nov;29(11):1840-50.

Arimura H, Shukunami C, Tokunaga T, Karasugi T, Okamoto N, Taniwaki T, *et al.* TGF- β 1 Improves Biomechanical Strength by Extracellular Matrix Accumulation Without Increasing the Number of Tenogenic Lineage Cells in a Rat Rotator Cuff Repair Model. *Am J Sports Med.* 2017 Aug;45(10):2394-404.

Arnoczky SP, Tian T, Lavagnino M, Gardner K, Schuler P, Morse P. Activation of stress-activated protein kinases (SAPK) in tendon cells following cyclic strain: the effects of strain frequency, strain magnitude, and cytosolic calcium. *J Orthop Res.* 2002;20:947-52.

Assunção JH, Godoy-Santos AL, dos Santos MC, Malavolta EA, Gracitelli ME, Ferreira Neto AA. Matrix Metalloproteases 1 and 3 Promoter Gene Polymorphism Is Associated With Rotator Cuff Tear. *Clin Orthop Relat Res.* 2017 Jul;475(7):1904-10.

Aszmann OC, Dellon AL, Birely BT, McFarland EG. Innervation of the human shoulder joint and its implications for surgery. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;330:202-7.

Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*. 2002;296:1646-7.

Baumgarten KM, Gerlach D, Galatz LM, Teefey SA, Middleton WD, Ditsios K, *et al*. Cigarette smoking increases the risk for rotator cuff tears. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468:1534-41.

Belangero PS, Leal MF, Cohen C, Figueiredo EA, Smith MC, Andreoli CV, *et al*. Expression analysis of genes involved in collagen cross-linking and its regulation in traumatic anterior shoulder instability. *J Orthop Res*. 2015;34:510-7.

Belangero PS, Leal MF, Figueiredo EA, Cohen C, Andreoli CV, Smith MC, *et al*. Differential expression of extracellular matrix genes in glenohumeral capsule of shoulder instability patients. *Connect Tissue Res*. 2016;57:290-8.

Birk DE, Mayne R. Localization of collagen types I, III and V during tendon development. Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter. *Eur J Cell Biol*. 1997;72:352-61.

Birk DE. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron*. 2001;32:223-37.

Bishop JY, Santiago-Torres JE, Rimmke N, Flanigan DC. Smoking predisposes to rotator cuff pathology and shoulder dysfunction: a systematic review. *Arthroscopy*. 2015;31:1598-1605.

Blevins FT, Djurasovic M, Flatow EL, Vogel KG. Biology of the rotator cuff tendon. *Orthop Clin North Am*. 1997;28:1-16.

Boot-Handford RP, Tuckwell DS. Fibrillar collagen: the key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. *Bioessays*. 2003;25:142-51.

Boon J, de Beer M, Botha D, Maritz NG, Fouche AA. The anatomy of the subscapularis tendon insertion as applied to rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg*. 2004;13:165-9.

Carbone S, Gumina S, Arceri V, Campagna V, Fagnani C, Postacchini F. The impact of preoperative smoking habit on rotator cuff tear: cigarette smoking influences rotator cuff tear sizes. *J Shoulder Elbow Surg.* 2012 Jan;21(1):56-60.

Carey WA, Taylor GD, Dean WB, Bristow JD. 2010. Tenascin-C deficiency attenuates TGF- β -mediated fibrosis following murine lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299:L785-L793.

Chansky HA, Iannotti JP. The vascularity of the rotator cuff. *Clin Sports Med.* 1991;10(4):807-22. Review.

Chillemi C, Petrozza V, Garro L, Sardella B, Diotallevi R, Ferrara A, *et al.* Rotator cuff re-tear or non-healing: histopathological aspects and predictive factors. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19:1588-96.

Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3. pii: a004960.

Chung SW, Choi BM, Kim JY, Lee YS, Yoon JP, Oh KS, *et al.* Altered Gene and Protein Expressions in Torn Rotator Cuff Tendon Tissues in Diabetic Patients. *Arthroscopy.* 2017 Mar;33(3):518-26.e1.

Clark JM, Harryman DT. Tendons, ligaments, and capsule of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg.* 1992;74-A:713-25.

Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol.* 1994;30(3):293-8.

Codman EA. The shoulder: rupture of the supraspinatus tendon and other lesions in or about the subacromial bursa. Boston: Thomas Todd; 1934; p. 65-107.

Cofield RH. Subscapular muscle transposition for repair of chronic rotator cuff tears. *Surg Gynecol Obstet.* 1982;154:667-72.

Cohen C, Leal MF, Belangero PS, Figueiredo EA, Smith MC, Andreoli CV, *et al.* The roles of Tenascin C and Fibronectin 1 in adhesive capsulitis: a pilot gene expression study. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016 Jul;71(6):325-31.

Collins M, Posthumus M. Type V collagen genotype and exercise-related phenotype relationships: a novel hypothesis. *Exerc Sport Sci Ver*. 2011;39(4):191-8.

Cordova A, Tripoli M, Corradino B, Napoli P, Moschella F. Dupuytren's contracture: an update of biomolecular aspects and therapeutic perspectives. *J Hand Surg Br*. 2005;30:557-62.

Craig AS, Birtles MJ, Conway JF, Parry DA. An estimate of the mean length of collagen fibrils in rat tail-tendon as a function of age. *Connect Tissue Res*. 1989;19:51-62.

Curtis AS, Burbank KM, Tierney JJ, Scheller AD, Curran AR. The insertional footprint of the rotator cuff: an anatomic study. *Arthroscopy*. 2006; Jun;22(6):609.e1.

Dabija DI, Gao C, Edwards TL, Kuhn JE, Jain NB. Genetic and familial predisposition to rotator cuff disease: a systematic review. *J Shoulder Elbow Surg*. 2017 Jun;26(6):1103-12.

Dallas SL, Sivakumar P, Jones CJ, Chen Q, Peters DM, Mosher DF, *et al.* Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1. *J Biol Chem*. 2005;280:18871-80.

Dark A, Ginn KA, Halaki M. Shoulder muscle recruitment patterns during commonly used rotator cuff exercises: an electromyographic study. *Phys Ther*. 2007;87:1039-46.

Dean BJ, Franklin SL, Carr AJ. A systematic review of the histological and molecular changes in rotator cuff disease. *Bone Joint Res*. 2012;1:158-66.

Dias D, Matos M, Daltro C, Guimarães A. Clinical and functional profile of patients with the painful shoulder syndrome (PSS). *Ortop Traumatol Rehabil.* 2008;10:547-53.

Ebner R, Chen RH, Lawler S, Zioncheck T, Derynck R. Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF- beta or activin. *Science.* 1993;262:900-2.

Ejnisman B, Andreoli CV, Soares BG, Fallopa F, Peccin MS, Abdalla RJ. Interventions for tears of the rotator cuff in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;1:CD002758.

Fabiś J, Szemraj J, Strek M, Fabiś A, Dutkiewicz Z, Zwierzchowski TJ. Is resection of the tendon edge necessary to enhance the healing process? An evaluation of the homeostasis of apoptotic and inflammatory processes in the distal 1 cm of a torn supraspinatus tendon: part I. *J Shoulder Elbow Surg.* 2014 Dec;23(12):1772-8.

Fuchs B, Weishaupt D, Zanetti M, Hodler J, Gerber C. Fatty degeneration of the muscles of the rotator cuff: assessment by computed tomography versus magnetic resonance imaging. *J Shoulder Elbow Surg.* 1999;8:599-605.

Galatz LM, Silva MJ, Rothermich SY, Zaegel MA, Havlioglu N, Thomopoulos S. Nicotine delays tendon-to-bone healing in a rat shoulder model. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88:2027-34.

Galloway MT, Lalley AL, Shearn JT. The Role of Mechanical Loading in Tendon Development, Maintenance, Injury, and Repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95A:1620-8.

Gardner E, Gray DJ, O'Rahilly. O membro superior. In: Gardner E, Gray DJ, O'Rahilly, editores. *Anatomia: estudo regional do corpo humano.* 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1978. p. 71-97.

Garrett WE, Speer KP, Kirkendall DT. Principles and practice of orthopaedic sports medicine. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

Giorgi S, Saracino M, Castagna A. Degenerative disease in rotator cuff tears: what are the biochemical and histological changes? *Joints*. 2014;2:26-8.

Godinho GG, Freitas JMA, França FO, Andrade Filho JS, Schio C, Pinto Jr SC. Estudo da vascularização das bordas das lesões nas roturas completas do manguito rotador. *Rev Bras Ortop*. 2007;42(6):169-72.

Goodier HC, Carr AJ, Snelling SJ, Roche L, Wheway K, Watkins B, *et al*. Comparison of transforming growth factor beta expression in healthy and diseased human tendon. *Arthritis Res Ther*. 2016;18:48.

Goutallier D, Postel JM, Van Driessche S, Voisin MC. [Histological lesions of supraspinatus tendons in full thickness tears of the rotator cuff]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. 2005;91:109-13. French.

Gotoh M, Mitsui Y, Shibata H, Yamada T, Shirachi I, Nakama K. Increased matrix metalloprotease-3 gene expression in ruptured rotator cuff tendons is associated with postoperative tendon retear. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013;21:1807-12.

Habermeyer P, Schiller K, Schweiberer L. Rotatorenmanschette. In: Habermeyer P, Krueger P, Schweiberer L, editors. *Schulterchirurgie*. München: Urban und Schwarzenberg; 1990. p. 149-167.

Han S, Makareeva E, Kuznetsova NV, DeRidder AM, Sutter MB, Losert W, *et al*. Molecular mechanism of type I collagen homotrimer resistance to mammalian collagenases. *J Biol Chem*. 2010;285: 22276-81.

Harvie P, Ostlere SJ, Teh J, McNally EG, Clipsham K, Burston BJ, *et al*. Genetic 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.

Holmes MV, Shah SH, Angelakopoulou A, Khan T, Swerdlow D, Kuchenbaecker K, *et al.* Complex disease genetics: present and future translational applications. *Genome Med.* 2009;1:104.

Hoog CL, Mann M. Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004;5:267-93.

Huang SW, Wang WT, Chou LC, Liou TH, Chen YW, Lin HW. Diabetes mellitus increases the risk of rotator cuff tear repair surgery: A population-based cohort study. *J Diabetes Complications.* 2016;30:1473-7.

Ingham KC, Brew SA, Erickson HP. Localization of a cryptic binding site for tenascin on fibronectin. *J Biol Chem.* 2004 Jul 2;279(27):28132-5.

Ikemoto RY, Murachovsky J, Nascimento LGP, Bueno RS, Ueno FH, Júnior JA. Avaliação da microcirculação das bordas do tendão do supra-espinal nas lesões do manguito rotador. *Rev Bras Ortop.* 2007;42:382-6.

Järvinen M, Józsa L, Kannus P, Järvinen TL, Kvist M, Leadbetter W. Histopathological findings in chronic tendon disorders. *Scand J Med Sci Sports.* 1997;7:86-95.

Jerosch J, Castro WH. Stress on the rotator cuff sutures in relation to joint position. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1993;131:317-22.

Karsenty G, Park RW. Regulation of type I collagen genes expression. *Int Rev Immunol* 1995;12:177-85.

Kelly BT, Kadrmas WR, Speer KP. The manual muscle examination for rotator cuff strength. An electromyographic investigation. *Am J Sports Med.* 1996;24:581-8.

Ker RF. Mechanics of tendon, from an engineering perspective. *Int J Fatigue.* 2007;29:1001-9.

Kluger R, Burgstaller J, Vogl C, Brem G, Skultety M, Mueller S. A candidate gene approach identifies six SNPs in tenascin-C (TNC) associated with degenerative rotator cuff tears. *J Orthop Res.* 2017a Apr;35(4):894-901.

Kluger R, Huber KR, Seely PG, Berger CE, Frommlet F. Novel Tenascin-C Haplotype Modifies the Risk for a Failure to Heal After Rotator Cuff Repair. *Am J Sports Med.* 2017b Nov;45(13):2955-64.

Leal MF, Belangero PS, Figueiredo EA, Cohen C, Loyola LC, Andreoli CV, *et al.* Identification of suitable reference genes for gene expression studies in tendons from patients with rotator cuff tear. *PLoS One.* 2015 Mar 13;10(3):e0118821.

Leal MF, Arliani GG, Astur DC, Franciozi CE, Debieux P, Andreoli CV, *et al.* Comprehensive selection of reference genes for expression studies in meniscus injury using quantitative real-time PCR. *Gene.* 2016;584:60-8.

Leal MF, Caires dos Santos L, Martins de Oliveira A, Santoro Belangero P, Antônio Figueiredo E, Cohen C, *et al.* Epigenetic regulation of metalloproteinases and their inhibitors in rotator cuff tears. *PLoS One.* 2017 Sep 13;12(9):e0184141.

Lee SB, Kim KJ, O'Driscoll SW, Morrey BF, An KN. Dynamic glenohumeral stability provided by the rotator cuff muscles in the mid-range and end-range of motion: a study in cadavera. *J Bone Joint Surg Am.* 2000;82(6):849-57.

Lee YS, Kim JY, Kim HN, Lee DW, Chung SW. Gene Expression Patterns Analysis in the Supraspinatus Muscle after a Rotator Cuff Tear in a Mouse Model. *Biomed Res Int.* 2018 Dec 23;2018:5859013.

Lehman C, Cuomo F, Kummer FJ, Zuckerman JD. The incidence of full thickness rotator cuff tears in a large cadaveric population. *Bull Hosp Jt Dis.* 1995;54(1):30-1.

LeRoy EC, Trojanowska MI, Smith EA. Cytokines and human fibrosis. *Eur Cytokine Netw.* 1990;1(4):215-9.

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.

Lin TT, Lin CH, Chang CL, Chi CH, Chang ST, Sheu WH. The effect of diabetes, hyperlipidemia, and statins on the development of rotator cuff disease: a nationwide, 11-year, longitudinal, population-based follow-up study. *Am J Sports Med.* 2015;43:2126-32.

Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1852-6.

Lo IK, Boorman R, Marchuk L, Hollinshead R, Hart DA, Frank CB. Matrix molecule mRNA levels in the bursa and rotator cuff of patients with full-thickness rotator cuff tears. *Arthroscopy.* 2005;21(6):645-51.

Lo IK, Marchuk LL, Hollinshead R, Hart DA, Frank CB. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase mRNA levels are specifically altered in torn rotator cuff tendons. *Am J Sports Med.* 2004;32:1223-9.

Longo UG, Franceschi F, Ruzzini L, Rabitti C, Morini S, Maffulli N, *et al.* Histopathology of the supraspinatus tendon in rotator cuff tears. *Am J Sports Med.* 2008;36(3):533-8.

Longo UG, Loppini M, Margiotti K, Salvatore G, Berton A, Khan WS, *et al.* Unravelling the genetic susceptibility to develop ligament and tendon injuries. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2015;10:56-63.

Longo UG, Margiotti K, Petrillo S, Rizzello G, Fusilli C, Maffulli N, De Luca A, Denaro V. Genetics of rotator cuff tears: no association of *COL5a1* gene in a case-control study. *BMC Med Genet.* 2018 Dec 20;19(1):217.

Longo UG, Salvatore G, Rizzello G, Berton A, Ciuffreda M, Candela V, Denaro V. The burden of rotator cuff surgery in Italy: a nationwide registry study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2017;137:217-24.

Lui PP, Rui YF, Ni M, Chan KM. Tenogenic differentiation of stem cells for tendon repair-what is the current evidence? *J Tissue Eng Regen Med.* 2011;5:e144-e163.

Mackie EJ, Halfter W, Liverani D: induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol* 1988;107:2757-67.

Maffulli N, Longo UG, Berton A, Loppini M, Denaro V. Biological factors in the pathogenesis of rotator cuff tears. *Sports Med Arthrosc.* 2011b;19:194-201.

Maffulli N, Longo UG, Franceschi F, Rabitti C, Denaro V. Movin and Bonar scores assess the same characteristics of tendon histology. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466:1605-11.

Maffulli N, Longo UG, Gougoulias N, Caine D, Denaro V. Sport injuries: a review of outcomes. *Br Med Bull.* 2011;97:47-80.

Maffulli N, Longo UG, Loppini M, Denaro V. Current treatment options for tendinopathy. *Expert Opin Pharmacother.* 2010;11:2177-86.

Mallon WJ, Misamore G, Snead DS, Denton P. The impact of preoperative smoking habits on the results of rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg.* 2004;13(2):129-32.

Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal.* 2009;3:287-310.

Millar NL, Wei AQ, Molloy TJ, Bonar F, Murrell GA. Heat shock protein and apoptosis in supraspinatus tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466:1569-76.

Millar NL, Murrell GA, McInnes IB. Inflammatory mechanisms in tendinopathy—towards translation. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13:110-22.

Minagawa H, Yamamoto N, Abe H, Fukuda M, Seki N, Kikuchi K, *et al*. Prevalence of symptomatic and asymptomatic rotator cuff tears in the general population: From mass-screening in one village. *J Orthop*. 2013;10:8-12.

Miyazaki AN, Itoi E, Sano H, Fregoneze M, Santos PD, da Silva LA, *et al*. Comparison between the acromion index and rotator cuff tears in the Brazilian and Japanese populations. *J Shoulder Elbow Surg*. 2011 Oct;20(7):1082-6.

Mokone GG, Schwellnus MP, Noakes TD, Collins M. The *COL5A1* gene and Achilles tendon pathology. *Scand J Med Sci Sports*. 2006;16:19-26.

Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*. 2003;33:381-94.

Moore-Smith L, Pasche B. *TGFBR1* signaling and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011;16:89-95.

Motta Gda R, Amaral MV, Rezende E, Pitta R, Vieira TC, Duarte ME, *et al*. Evidence of genetic variations associated with rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 2014;23:227-35.

Nagura I, Kokubu T, Mifune Y, Inui A, Takase F, Ueda Y, *et al*. Characterization of progenitor cells derived from torn human rotator cuff tendons by gene expression patterns of chondrogenesis, osteogenesis, and adipogenesis. *J Orthop Surg Res*. 2016 Mar 31;11:40.

Neer CS 2nd. Anterior acromioplasty for the chronic impingement syndrome in the shoulder: a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am*. 1972 Jan;54(1):41-50.

Netter FH. *Atlas de Anatomia Humana*. 6a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson – Genética Médica. 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Nyffeler RW, Werner CM, Sukthankar A, Schmid MR, Gerber C. Association of a large lateral extension of the acromion with rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(4):800-5.

Pabalan N, Tharabenjasin P, Phababpha S, Jarjanazi H. Association of *COL5A1* gene polymorphisms and risk of tendon-ligament injuries among Caucasians: a meta-analysis. *Sports Med Open*. 2018;4(1):46.

Parry DAD, Craig AS. Quantitative Electron-Microscope Observations of collagen Fibrils in Rat- Tail Tendon. *Biopolymers*. 1977;16:1015-31.

Pinto Júnior SC, Luciano LG, Dal Zotto C, Vieira FF, Klassen R, Rodrigues A, *et al*. Resultado da reparação do manguito rotador em lesões do tipo C1 e C2 de Snyder, considerando fumantes e não fumantes. *Rev bras ortop*. 2010;45(6):554-6.

Rashid MS, Cooper C, Cook J, Cooper D, Dakin SG, Snelling S, *et al*. Increasing age and tear size reduce rotator cuff repair healing rate at 1 year. *Acta Orthop*. 2017 Dec;88(6):606-11.

Retief E, Parker MI, Retief AE. Regional chromosome mapping of human collagen genes alpha 2(I) and alpha 1(I) (*COLIA2* and *COLIA1*) *Hum Genet*. 1985;69:304-8.

Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. Tendon degeneration and chronic shoulder pain - changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis*. 1994;53:359-66.

Riley GP, Harrall RL, Cawston TE, Hazleman BL, Mackie EJ. Tenascin-C and human tendon degeneration. *Am J Pathol*. 1996;149:933-43.

Riley GP, Curry V, DeGroot J, van El B, Verzijl N, Hazleman BL, *et al.* Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol.* 2002;21:185-95.

Riley GP. *Sports injuries.* New York: Oxford University Press; 2010.

Robertson CM, Chen CT, Shindle MK, Cordasco FA, Rodeo SA, Warren RF. Failed healing of rotator cuff repair correlates with altered collagenase and gelatinase in supraspinatus and subscapularis tendons. *Am J Sports Med.* 2012;40:1993-2001.

Sakai T, Yasuda K, Tohyama H, Azuma H, Nagumo A, Majima T, *et al.* Effects of combined administration of transforming growth factor-beta1 and epidermal growth factor on properties of the in situ frozen anterior cruciate ligament in rabbits. *J Orthop Res* 2002;20:1345-51.

Salles JI, Lopes LR, Duarte MEL, Morrissey D, Martins MB, Machado DE, *et al.* Fc receptor-like 3 (-169T>C) polymorphism increases the risk of tendinopathy in volleyball athletes: a case control study. *BMC Med Genet.* 2018 Jul 18;19(1):119.

Screen HRC, Bader DL, Lee DA, Shelton JC. Local strain measurement within tendon. *Strain.* 2004;40:157-63.

Screen HR, Berk DE, Kadler KE, Ramirez F, Young MF. Tendon functional functional extracellular matrix. *J Orthop Res.* 2015 Jun;33(6):793-9.

Sejersen MH, Frost P, Hansen TB, Deutch SR, Svendsen SW. Proteomics perspectives in rotator cuff research: a systematic review of gene expression and protein composition in human tendinopathy. *PLoS One.* 2015 Apr 16;10(4):e0119974.

September AV, Schweltnus MP, Collins M. Tendon and ligament injuries: the genetic component. *Br J Sports Med.* 2007;41:241-46; discussion 246.

Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci.* 1995;108(3):985-1002.

Shindle MK, Chen CC, Robertson C, DiTullio AE, Paulus MC, Clinton CM, *et al.* Full-thickness supraspinatus tears are associated with more synovial inflammation and tissue degeneration than partial-thickness tears. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011;20:917-27.

Shirachi I, Gotoh M, Mitsui Y, Yamada T, Nakama K, Kojima K, *et al.* Collagen production at the edge of ruptured rotator cuff tendon is correlated with postoperative cuff integrity. *Arthroscopy.* 2011;27:1173-9.

Soo C, Beanes SR, Hu FY, Zhang X, Dang C, Chang G, *et al.* Ontogenetic transition in fetal wound transforming growth factor-beta regulation correlates with collagen organization. *Am J Pathol.* 2003;163:2459-76.

Szomor ZL, Appleyard RC, Murrell GA. Overexpression of nitric oxide synthases in tendon overuse. *J Orthop Res.* 2006;24:80-6.

Tan SL, Ahmad RE, Ahmad TS, Merican AM, Abbas AA, Ng WM, *et al.* Effect of growth differentiation factor 5 on the proliferation and tenogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cells Tissues Organs.* 2012;196:325-38.

Tan SL, Ahmad TS, Ng WM, Azlina AA, Azhar MM, Selvaratnam L, *et al.* Identification of pathways mediating growth differentiation factor 5-Induced tenogenic differentiation in human bone marrow stromal cells. *PLoS ONE.* 2015;10:e0140869.

Teerlink CC, Cannon-Albright LA, Tashjian RZ. Significant association of full-thickness rotator cuff tears and estrogen-related receptor- β (ESRRB). *J Shoulder Elbow Surg.* 2015 Feb;24(2):e31-5.

Tempelhof S, Rupp S, Seil R. Age-related prevalence of rotator cuff tears in asymptomatic shoulders. *J Shoulder Elbow Surg.* 1999;8:296-9.

Tillander B, Franzen L, Norlin R. Fibronectin, MMP-1 and histologic changes in rotator cuff disease. *J Orthop Res.* 2002;20:1358-64.

Thankam FG, Roesch ZK, Dilisio MF, Radwan MM, Kovilam A, Gross RM, *et al.* Association of inflammatory responses and ECM disorganization with HMGB1 upregulation and NLRP3 inflammasome activation in the injured rotator cuff tendon. *Sci Rep.* 2018;8:8918.

Thankam FG, Dilisio MF, Gross RM, Agrawal DK. Collagen I: a kingpin for rotator cuff tendon pathology. *Am J Transl Res.* 2018;10(11):3291-309.

Thorpe CT, Birch HL, Clegg PD, Screen HR. The role of the non-collagenous matrix in tendon function. *Int J Exp Pathol.* 2013;94:248-59.

Torrens C, López JM, Puente I, Cáceres E. The influence of the acromial coverage index in rotator cuff tears. *J Shoulder Elbow Surg.* 2007;16(3):347-51.

Treviño EA, McFaline-Figueroa J, Guldberg RE, Platt MO, Temenoff JS. Full-thickness rotator cuff tear in rat results in distinct temporal expression of multiple proteases in tendon, muscle, and cartilage. *J Orthop Res.* 2018 Nov 20.

Vakonakis I, Campbell ID. Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19:578-83.

Varitimidis SE, Dailiana ZH, Christou D, Grafanaki K, Ioannou MG, Stathopoulos C, *et al.* Histological and biochemical evidence related to the collagen quality in torn rotator cuff tendons. *Acta Orthop Belg.* 2016.;82:179-88.

Vlaanderen J, Moore LE, Smith MT, Lan Q, Zhang L, Skibola CF, *et al.* Application of OMICS technologies in occupational and environmental health research; current status and projections. *Occup Environ Med.* 2010;67:136-43.

Xu Y, Murrell GA. The basic science of tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466:1528-38.

Yamamoto N, Mineta M, Kawakami J, Sano H, Itoi E. Risk factors for tear progression in symptomatic rotator cuff tears: a prospective study of 174 shoulders. *Am J Sports.* 2017;45:2524-31.

Wendelboe AM, Hegmann KT, Gren LH, Alder SC, White GL Jr, Lyon JL. Associations between body-mass index and surgery for rotator cuff tendinitis. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:743-7.

Wenstrup RJ, Florer JB, Davidson JM, Phillips CL, Pfeiffer BJ, Menezes DW, *et al.* Murine model of the Ehlers–Danlos syndrome. *COL5a1* haploinsufficiency disrupts collagen fibril assembly at multiple stages. *J Biol Chem.* 2006;281:12888-95.

Whitby DJ, Ferguson MWJ. The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal, and adult mice. *Development.* 1991;112:651-68.

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature.* 1994;370(6488):341-7.

Zollinger AJ, Smith ML. Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biol.* 2017 Jul;60-61:27-37.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]: Rio de Janeiro: IBGE; c2014 [cited 2018 Jan 10]. Available from: <https://www.ibge.gov.br/>.

Ferreira LM, Petroianu A, Aloise AC, Hochman B, Brandt CT, Veiga DF, Furtado FMGP, Nahas FX, Campos JHO, Ely PB, Marques RG. Projetos, dissertações e teses: orientação normativa: guia prático. São Paulo: Red Publicações; 2017.

List of journals indexed for Medline [Internet]. Washington: National Library of Medicine. 2005 Jun [cited 2017 Nov 11]. Available from: <http://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NAS LESÕES DO MANGUITO

Pesquisador: EDUARDO ANTÔNIO DE FIGUEIREDO

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 1

CAAE: 16627513.9.0000.5505

Instituição Proponente: Departamento de Morfologia e Genética

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 288.428

Data da Relatoria: 07/06/2013

Apresentação do Projeto:

O ombro é o terceiro sítio mais comum de doenças do sistema músculo esquelético depois da coluna e do joelho. Entre as afecções mais comuns e debilitantes do ombro, está a lesão dos tendões do manguito rotador. A etiologia dessa doença ainda é pouco conhecida, porém sabe-se que possui um componente genético. Tem sido proposto que alterações na matriz extracelular podem ser iniciadas por células do tendão e podem levar à proliferação, à migração, à apoptose e à morfogênese celular. A perda do balanço entre síntese e degradação de matriz extracelular pode estar envolvida na degeneração do tendão e, conseqüentemente, na ruptura do manguito. O presente projeto busca identificar polimorfismos de TGFβ1, TGFβ1R e KLF6 genes envolvidos, principalmente, na estrutura e no remodelamento de matriz extracelular de tendão. Ao nosso conhecimento, não há estudos na literatura que avaliaram o polimorfismo genético em lesão do manguito rotador. A investigação de mecanismos genéticos, envolvidos, principalmente, no processo de remodelamento de matriz extracelular poderá auxiliar na determinação mais precisa do prognóstico e no estabelecimento de uma conduta terapêutica, e também na identificação de possíveis alvos para novos fármacos usados no tratamento de lesão do manguito rotador. O projeto gerará novas informações biológicas que possibilitarão uma melhor compreensão da etiopatogenia e da fisiopatologia dessa afecção, com potencial aplicação na prática médica.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 288.428

METODOLOGIA: Casuística

Para a análise de polimorfismo, serão avaliados 200 pacientes com lesão do manguito rotador comprovada por exame físico e de imagem (raio-X, ultrassonografia ou ressonância) recrutados no serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital São Paulo, incluindo pacientes provenientes do Pronto-Socorro e dos Ambulatórios. Serão excluídos do estudo, pacientes com história de evento traumático no ombro, pacientes com diagnóstico de capsulite adesiva (lesão secundária). Adicionalmente, como grupo controle, serão recrutados 400 indivíduos saudáveis (voluntários) sem lesão no ombro, pareados por sexo, idade e ancestralidade.

Objetivo da Pesquisa:

1. Comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos TGFB1 (rs1800470 e rs1800469), TGFBRI (rs11568785 e rs1590), KLF6 (rs17731) entre pacientes com lesão de manguito rotador e em indivíduos controles, além de verificar se a população estudada encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.
2. Investigar a associação dos polimorfismos estudados com variáveis clínicas, tais como gênero, idade, ancestralidade, tempo de acometimento da afecção, lesão total ou parcial do manguito rotador, variáveis ortopédicas e comorbidades clínicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo, desconforto leve no procedimento de coleta de sangue

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto gerará novas informações biológicas que possibilitarão uma melhor compreensão da etiopatogenia e da fisiopatologia da lesão do manguito. A identificação de polimorfismos relevantes para essa doença pode ajudar no desenvolvimento de novos fármacos específicos para essa afecção.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos obrigatórios apresentados (FOLHA DE ROSTO, PROJETO DE PESQUISA E TCLE)

Recomendações:

NADA CONSTA

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem inadequações

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 Fax: (11)5571-1062 E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 268.426.

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer do relator acatado pelo colegiado

SAO PAULO, 29 de Maio de 2013

Assinador por:
José Osmar Medina Pestana
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O ombro é o terceiro sítio mais comum de doenças do sistema músculo esquelético depois da coluna e do joelho. Entre as afecções mais comuns e debilitantes do ombro, estão a lesão dos tendões do manguito rotador e a capsulite adesiva, conhecida também como "ombro congelado". A etiologia dessas doenças ainda não é conhecida, porém sabe-se que ambas as afecções possuem um componente genético. Tem sido proposto que alterações na matriz extracelular podem ser iniciadas por células do tendão, assim como possivelmente da cápsula, e podem levar à proliferação, à migração, à apoptose e à morfogênese celular. A perda do balanço entre síntese e degradação de matriz extracelular pode estar envolvida na degeneração do tendão e, conseqüentemente, na ruptura do manguito rotador e no processo de fibrose observado na capsulite adesiva. A investigação de mecanismos genéticos, transcricionais e epigenéticos envolvidos, principalmente, no processo de remodelamento de matriz extracelular poderá auxiliar na determinação mais precisa do prognóstico e no estabelecimento de uma conduta terapêutica, além da identificação de possíveis alvos para novos fármacos usados no tratamento de lesão do manguito rotador e capsulite adesiva. O projeto gerará novas informações biológicas que possibilitarão uma melhor compreensão da etiopatogenia e da fisiopatologia dessas duas afecções, com potencial aplicação na prática médica.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo

TCLE: Adequado, contemplando a resolução 196/96

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 146543,61

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 48 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 25/02/2013 e 20/02/2014

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

APÊNDICE 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de consentimento livre e esclarecido

AFECÇÕES ORTOPÉDICAS NÃO TRAUMÁTICAS DE OMBRO: ASPECTOS GENÉTICOS E MOLECULARES

As seguintes informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo.

O Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Escola Paulista de Medicina (EPM)/Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), que exerce suas atividades de ensino, assistência e de pesquisa no Hospital São Paulo – Hospital Universitário UNIFESP –, está desenvolvendo uma pesquisa, por meio da identificação das alterações genéticas e moleculares no quadro clínico do paciente, que permitirá identificar variantes associadas ao risco de lesão e conhecer melhor os mecanismos causadores das lesões ortopédicas e, conseqüentemente, oferecerá novas possibilidades de tratamento e determinação do prognóstico.

Serão obtidas amostras de tecido de ombro durante o procedimento cirúrgico. O procedimento é comum e frequente para os profissionais envolvidos. O fragmento retirado é muito pequeno, até mesmo difícil de ser visto a olho nu, e não representa qualquer tipo de problema ou piora de resultado no seu tratamento. Assim, a obtenção do fragmento de tecido de ombro para a pesquisa não implicará riscos adicionais no seu tratamento, na sua consulta médica ou na sua cirurgia, nem aumento no tempo do exame ou da cirurgia. O desconforto que poderá ocorrer será devido ao próprio procedimento cirúrgico. As amostras coletadas serão utilizadas para análise molecular. Será utilizado material estéril e descartável.

Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que alterações genéticas e moleculares estão envolvidas em afecções ortopédicas não traumáticas de ombro. Somente no final do estudo, poderemos identificar a presença de algum benefício.

Em qualquer etapa do estudo, o paciente ou seu responsável terá acesso aos profissionais relacionados com a pesquisa para esclarecimento de dúvidas. Os principais investigadores são Dr.^a Mariana Leal, Prof. Dr. Moisés Cohen, que podem ser encontrados na UNIFESP, rua Botucatu, 740, Departamento de Ortopedia e Traumatologia, telefone (011)5571-6621. Se houver alguma consideração a fazer, ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da UNIFESP, rua Botucatu, 572, 1.º andar, cj 14, 5571-1062, fax 5539-7162, e-mail: cepunifesp@epm.br.

É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. O material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras, preservando sua privacidade e identidade. Os resultados obtidos estarão à disposição do paciente. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do paciente.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consulta. Também não há compensação financeira relacionada à participação.

Na eventualidade de ocorrer qualquer dano pessoal causado direta ou indiretamente pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante terá direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações estabelecidas.

O material coletado será, primeiramente, utilizado somente nesta pesquisa. Porém, ele poderá ser usado em pesquisas futuras mediante somente a nova aprovação do participante. Futuros projetos também serão submetidos à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Afecções ortopédicas não traumáticas de ombro: aspectos genéticos e moleculares”.

Eu discuti com o Dr. _____

sobre minha decisão de participar do estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo em participar voluntariamente deste estudo e estou ciente de que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o

processo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste serviço.

Nome do paciente

Assinatura do participante / representante legal

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha


Para casos de voluntários menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou de seu representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: ____ / ____ / ____

APÊNDICE 3 – Questionário Geral Aplicado

 Registro da Disciplina de Genética: _____

Protocolo de Pesquisa
QUESTIONÁRIO GERAL autoaplicável

Médico responsável: _____ Data da cirurgia: _____

Nome do paciente: _____

Nome da mãe: _____

Sexo: Masculino Feminino Data de nascimento: _____

Endereço atual: _____

País: _____ Estado: _____ Cidade: _____

E-mails: _____

Telefones para contato: _____

Telefones e nome de parente para contato: _____

Etnia (observada pelo médico): Amarelo Branco Pardo Negro Outro

Naturalidade: País: _____ Estado: _____ Cidade: _____

Local de nascimento da mãe: _____

Local de nascimento do pai: _____

Local de nascimento da avó: Materna: _____ Paterna: _____

Local de nascimento do avô: Materno: _____ Paterno: _____

Peso (kg): _____ Altura (m): _____

Dominância:

Braços: Destro Canhoto Ambidestro

Pernas: Destro Canhoto Ambidestro

PROFISSÃO:

Atual: _____ Manual Não manual

Anterior à lesão: Igual Outra: _____ Manual Não manual

ATIVIDADE FÍSICA/ESPORTE

Atividade física/esporte principal: Qual? _____ Atual Passado Frequência (por semana): _____

Idade em que começou a praticar: _____ N.º de anos praticando: _____

Outra atividade física/esporte (2): Qual? _____ Atual Passado Frequência (por semana): _____

Idade em que começou a praticar: _____ N.º de anos praticando: _____

Outra Atividade física/esporte (3): Qual? _____ Atual Passado Frequência (por semana): _____

Idade em que começou a praticar: _____ N.º de anos praticando: _____

Observações (posição, nível, etc): _____

LESÃO DE ATUAL: Joelho Ombro Tornozelo

Tipo: Luxação ombro primeiro episódio Tendinite calcária do manguito rotador Lesão do manguito rotador Capsulite adesiva

Outros: _____

Lado de acometimento: Direito Esquerdo

Quando ocorren? (tempo de lesão até coleta) _____

Mecanismo de lesão: Traumático Não traumático Qual? _____

Tratamento não cirúrgico: (indicar a duração e se foi concluído)

Medicamentos: _____

Fisioterapia: _____ Outros: _____

Realizou infiltrações pelo problema atual? Sim - N.º: _____ Não

As infiltrações foram realizadas com qual medicamento? Não sabe Corticoide Anestésico local

Outros: _____

Quais são os sintomas atuais: Dor Inchaço Instabilidade (sensação de que o ombro sai do lugar)

Fraqueza Perda de movimento Outro: _____

Atualmente, você pratica esportes: Nenhum Limitado a exercícios sem carga Limitado, não no mesmo nível anterior à lesão Participa ativamente

LESÕES PRÉVIAS: Joelho: Sim Não Ombro: Sim Não Tornozelo: Sim Não

Tipo: Luxação ombro: _____ (número de episódios que ocorreram) Tendinite calcária do manguito rotador
 Lesão do manguito rotador Capsulite adesiva

Lado de acometimento: Direito Esquerdo

Se mais que uma lesão, detalhar: _____
 Quando ocorreu? _____

Mecanismo de lesão: Traumático Não traumático Qual? _____

Tratamento: (indicar a duração e se foi concluído)

Cirurgia: _____ Medicamentos: _____
 Fisioterapia: _____ Outros: _____

HÁBITO TABAGISTA: Nunca fumou Parou Tabagista
 Se sim: número de anos: _____ Frequência (cigarros/dia): _____
 Se parou: Há quanto tempo parou de fumar? _____

HÁBITO ETÍLICO: Nunca bebeu Bebia, porém parou Bebe socialmente Bebe rotineiramente

USO DE MEDICAMENTOS CONTÍNUOS: Sim - Qual? _____ Não

USO DE ANABOLIZANTES: Sim - Qual? _____ Não

COMORBIDADES CLÍNICAS:

Osteoartrose Contratura de Dupuytren Asma/bronquite Fibromialgia Acidente cerebrovascular
 Cardiopatia Hipertensão arterial sistêmica Marcapasso Hipertrigliceridemia Dislipidemia
 Litíase renal Insuficiência renal Hiperuricemia
 Diabetes mellitus - Tipo 1 Tipo 2 Insulino-dependente Não insulino-dependente
 Tireopatia - Hipertireoidismo Hipotireoidismo Outra _____

Doenças autoimunes - Qual? _____ Tratamento: _____
 Doenças psiquiátrica - Qual? _____ Tratamento: _____
 Câncer - Qual? _____ Tratamento: _____
 Doenças do tecido conectivo ou reumatológicas (reumatismo) - Qual? _____
 Tratamento: _____
 Outras/especificações: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES
 Alguém na família (avós, pais, irmãos, tios, sobrinhos, filhos, netos) tem ou teve algum problema no ombro?
 Sim Não

(1) Quem (especifique o grau de parentesco da pessoa e se do lado paterno ou materno)? _____
 (1) Qual problema no joelho? _____
 (2) Quem (especifique o grau de parentesco da pessoa e se do lado paterno ou materno)? _____
 (2) Qual problema no joelho? _____
 (3) Quem (especifique o grau de parentesco da pessoa e se do lado paterno ou materno)? _____
 (3) Qual problema no joelho? _____

Alguém na família tem ou teve algum problema em outra articulação (joelho, cotovelo, quadril, tornozelo)?
 Sim Não

(1) Quem (especifique o grau de parentesco da pessoa e se do lado paterno ou materno)? _____
 (1) Qual problema no joelho? _____
 (2) Quem (especifique o grau de parentesco da pessoa e se do lado paterno ou materno)? _____
 (2) Qual problema no joelho? _____
 (3) Quem (especifique o grau de parentesco da pessoa e se do lado paterno ou materno)? _____
 (3) Qual problema no joelho? _____



Registro da Disciplina de Genética: _____

Protocolo de Pesquisa**QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES COM LESÃO DO MANGUITO ROTADOR (preenchido pelo médico)**

Nome do paciente: _____

Registro hospitalar: _____

Data Cirurgia: _____ Local Cirurgia: _____
Cirurgia (descrever tipo de procedimento e achados relevantes intra-operatórios): _____**LESÃO**Região: _____ Tipo: Total Parcial
Se total, classificação de Cofield (1982): Pequena <1cm Média 1-3cm Grande 3-5cm Maciça >5 cm
Extensão: _____ cm Mensuração: Ressonância magnética Ultrassom (padrão do estudo) Outro _____**EXAME FÍSICO**Desequilíbrio muscular: Sim Não Não avaliado Atrofia muscular: Sim Não Não avaliadoMovimetização ativa: Lado direito: Sim Não Elevação ombro (em graus) _____
Lado esquerdo: Sim Não Elevação ombro (em graus) _____
 Não avaliadoMovimentação passiva: Lado direito: Sim Não Elevação ombro (em graus) _____
Lado esquerdo: Sim Não Elevação ombro (em graus) _____
 Não avaliadoForça muscular (0-5) para elevação do ombro: Lado direito: _____ Lado esquerdo: _____ Não avaliadoTeste de Jobe positivo: Positivo Negativo Não avaliadoTeste da apreensão: Positivo Negativo Não avaliado**Testes de impacto:**-Hawkins-kennedy: Positivo Negativo Não avaliado-Yokun: Positivo Negativo Não avaliado-Neer: Positivo Negativo Não avaliado**ANTECEDENTES PESSOAIS**

| | | |
|----------------------------------|--|--|
| Luxação do ombro | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado | Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo |
| Bursite | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado | Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo |
| Fraturas | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado | Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo |
| Tendinite calcária | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado | Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo |
| Tendinopatia do bíceps | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado | Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo |
| Tendinopatia do manguito rotador | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado | Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo |
| Tendinopatia do bíceps | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado | Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo |
| Capsulite adesiva | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado | Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo |

ANEXOS

Nessa sessão, serão apresentados, os artigos publicados relacionados à linha de pesquisa. Os artigos são apresentados em ordem cronológica reversa.

ANEXO 1 - Artigo publicado na revista *Journal of Orthopaedic Research*

1

Research Article

Genetic variants involved in extracellular matrix homeostasis play a role in the susceptibility to frozen shoulder: a case-control study.[†]

Running title: Genetic susceptibility to frozen shoulder

Carina Cohen^{1*}, Mariana Ferreira Leal^{1,2*}, Leonor Casilla Loyola^{1,2}, Sidney Emanuel Batista Santos³, Ândrea Kely Campos Ribeiro-dos-Santos³, Paulo Santoro Belangero¹, Eduardo Antônio Figueiredo¹, Andre Wajnsztein¹, Adrielle Martins de Oliveira^{1,2}, Marília Cardoso Smith², Carlos Vicente Andreoli¹, Alberto de Castro Pochini¹, Moises Cohen¹, Benno Ejnisman¹, Flávio Faloppa¹.

***Both authors contributed equally to this study**

¹Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, 04038-032, São Paulo, SP, Brazil

²Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, 04023-001, São Paulo, SP, Brazil

³Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil.

Corresponding author: Mariana Ferreira Leal, Ph.D. Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, Rua Borges Lagoa, 783, CEP: 04038-032, São Paulo, SP, Brazil. Email: mariana.morf@cpm.br; Tel.: +55-11-55716621; Fax: +55-11-55716621.

[†]This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: [10.1002/jor.24228]

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Received 28 April 2018; Revised 19 December 2018; Accepted 26 December 2018

Journal of Orthopaedic Research®

This article is protected by copyright. All rights reserved

DOI 10.1002/jor.24228

This article is protected by copyright. All rights reserved

ANEXO 2 - Artigo publicado na revista *Journal of Orthopaedic Research*

Changes in the Expression of Matrix Extracellular Genes and TGFB Family Members in Rotator Cuff Tears

Paulo Santoro Belangero,¹ Eduardo Antonio Figueiredo,¹ Carina Cohen,¹ Felipe de Seixas Alves,^{1,2} Wânia Hiromi Yanaguizawa,^{1,2} Marlia Cardoso Smith,³ Carlos Vicente Andreoli,¹ Alberto de Castro Pochini,¹ Maria Teresa de Seixas Alves,² Benno Ejnisman,¹ Moises Cohen,¹ Mariana Ferreira Leal^{1,3}

¹Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, Rua Borges Lagoa, 783, São Paulo, São Paulo 04038-032, Brazil, ²Departamento de Patologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo 04038-032, Brazil, ³Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo 04023-001, Brazil

Received 24 May 2017; accepted 18 March 2018

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jor.23907

ABSTRACT: Lack of synthesis of extracellular matrix compounds may contribute to degeneration of the tendons. Thus, we aimed to evaluate the expression of extracellular matrix and TGFB family members in ruptured and non-ruptured tendons of the rotator cuff, as well as the effect of clinical factors on gene expression in tendon samples, and the relationship between histological findings and altered gene expression. Injured and non-injured supraspinatus tendon samples and subscapular non-injured tendon samples were collected from 38 patients with rotator cuff tears. Non-injured supraspinatus tendons were obtained from eight controls. Specimens were used for histological evaluation, quantification of collagen fibers, and mRNA and protein expression analyses. Increased *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *FN1*, *TNC*, and *TGFB1* mRNA expression was observed in the tear samples ($p < 0.05$). Duration of symptoms was correlated with the levels of collagen type I/III fibers ($p = 0.032$; $\rho = 0.0447$) and FN1 immunostaining ($p = 0.031$; $\rho = 0.417$). Smoking was associated with increased frequency of microcysts, myxoid degeneration, and *COL5A1*, *FN1*, *TNC*, and *TGFB1* mRNA expression ($p < 0.05$). FN1 immunostaining was correlated with the number of years of smoking ($p = 0.048$; $\rho = 0.384$). Lower levels of collagen type I/III fibers were detected in samples with fissures ($0 = 0.046$). High frequency of microcysts was associated with increased *COL5A1*, *FN1*, and *TNC* expression ($p < 0.05$, for all comparisons). Neovascularization was associated with reduced *FN1* ($p = 0.035$) and *TGFB1* expression ($p = 0.034$). Our findings show differential expression of matrix extracellular genes and TGFB family members in the degeneration process involved in rotator cuff tears. These molecular alterations are influenced by clinical factors. © 2018 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res*

Keywords: rotator cuff tear; histology; gene and protein expression; extracellular matrix; TGFB family

Rotator cuff disease is a common cause of shoulder pain and dysfunction, especially in older and sedentary people.¹ Many extrinsic factors (e.g., impingement and demographic factors) and intrinsic factors (e.g., age-related degeneration, hypovascularity, inflammation, and oxidative stress) have been proposed to explain the cause and progression of rotator cuff tears.¹

Tendons are constituted of tenoblasts and tenocytes lying within a network of extracellular matrix (ECM).² The ECM of tendons are mainly composed of collagens, proteoglycans, glycosaminoglycans, glycoproteins, and several other small molecules.² Increased degradation of ECM and a subsequent lack of increased synthesis may lead to structural deterioration and degeneration of the tendons.³

Changes in collagen content and composition have consistently been found in tendinopathy.³ Normal

tendons are predominantly composed of type I collagen fibers, which is usually a heterotrimer of $\alpha 1$ chains (COL1A1) and $\alpha 2$ chains (COL1A2).⁴ However, during joint healing, it is postulated that type III collagen expression (COL3A1) is increased and that the increased ratio of types I and III collagens may be an indicator of total repair response.⁵ Fibrillogenesis is a complex process and collagen V (COL5A1 and COL5A2) appears to play a critical role in its regulation.⁶ Further investigation is necessary to understand the relationship between collagen expression and the heterogeneity of human rotator cuff tears.

Fibronectin 1 (FN1) and tenascin C (TNC) glycoproteins are involved in several biological processes, including cell adhesion and wound healing.^{7,8} These glycoproteins maintain the homeostasis of the ECM of the joints by regulating collagen fibril assembly.⁹ Some authors have reported increased expression of these proteins in injured tendons.^{3,9,10}

Transforming growth factor beta 1 (TGFB1) has been shown to increase the breaking energy of a healing tendon.¹¹ TGFB1 activity is mediated by its dimerization with its receptors, including TGFB receptor I (TGFBRI).¹² TGFB1 regulates and is regulated by several ECM proteins, including FN1^{13,14} and TNC.^{15,16}

Growth differentiation factor 5 (GDF5) is another TGFB family member. In vitro studies demonstrated that GDF5 is one of the key factors in tenogenic differentiation and proliferation of mesenchymal stem cells.¹⁷ Additionally, GDF5 induces the upregulation of

Paulo S. Belangero and Eduardo A. Figueiredo contributed equally to this study.

Moises Cohen and Mariana F. Leal contributed equally as principal investigators.

Conflicts of interest: All authors declare that they have no conflicts of interest in the authorship or publication of this contribution.

Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; Grant numbers: 2011/22548-2, 2012/14768-5, 2013/10691-0, 2013/10791-5.

Correspondence to: Mariana F. Leal (T: +55-11-55716621; F: +55-11-55716621; E-mail: mariana.mor@opm.br)

© 2018 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc.

ANEXO 3 - Artigo publicado na revista *PLOS ONE*

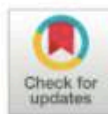
RESEARCH ARTICLE

Epigenetic regulation of metalloproteinases and their inhibitors in rotator cuff tears

Mariana Ferreira Leal^{1,2*}, Leonardo Caires dos Santos², Adrielle Martins de Oliveira^{1,2}, Paulo Santoro Belangero¹, Eduardo Antônio Figueiredo¹, Carina Cohen¹, Felipe de Seixas Alves^{1,3}, Wânia Hiromi Yanagizawa^{1,3}, Carlos Vicente Andreoli¹, Alberto de Castro Pochini¹, Benno Eijnisman¹, Marília Cardoso Smith², Maria Teresa de Seixas Alves³, Moises Cohen¹

1 Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **2** Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **3** Departamento de Patologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

* mariana.morfi@epm.br



OPEN ACCESS

Citation: Leal MF, Caires dos Santos L, Martins de Oliveira A, Santoro Belangero P, Antônio Figueiredo E, Cohen C, et al. (2017) Epigenetic regulation of metalloproteinases and their inhibitors in rotator cuff tears. *PLoS ONE* 12(9): e0184141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184141>

Editor: Helena Kuivaniemi, Stellenbosch University Faculty of Medicine and Health Sciences, SOUTH AFRICA

Received: May 24, 2017

Accepted: August 18, 2017

Published: September 13, 2017

Copyright: © 2017 Leal et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The study was supported by: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) as grant #2011/22548-2 (PI: MFL) and fellowships #2012/14768-5 (MFL), #2016/01392-8 (AMO), #2016/15785-1 (AMO), #2013/10691-0 (FSA), #2013/10791-5 (WHY) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Abstract

Rotator cuff tear is a common orthopedic condition. Metalloproteinases (MMP) and their inhibitors (TIMP) seem to play a role in the development of joint injuries and in the failure of tissue healing. However, the mechanisms of regulation of gene expression in tendons are still unknown. Epigenetic mechanisms, such as DNA methylation and microRNAs regulation, are involved in the dynamic control of gene expression. Here, the mRNA expression and DNA methylation status of *MMPs* (*MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP9*, *MMP13*, and *MMP14*) and *TIMPs* (*TIMP1-3*) and the expression of miR-29 family members in ruptured supraspinatus tendons were compared with non-injured tendons of individuals without this lesion. Additionally, the gene expression and methylation status at the edge of the ruptured tendon were compared with macroscopically non-injured rotator cuff tendon samples from the anterior and posterior regions of patients with tendon tears. Moreover, the possible associations between the molecular alterations and the clinical and histologic characteristics were investigated. Dysregulated expression and DNA methylation of *MMP* and *TIMP* genes were found across the rotator cuff tendon samples of patients with supraspinatus tears. These alterations were influenced at least in part by age at surgery, sex, smoking habit, tear size, and duration of symptoms. Alterations in the studied *MMP* and *TIMP* genes may contribute to the presence of microcysts, fissures, necrosis, and neovascularization in tendons and may thus be involved in the tendon healing process. In conclusion, MMPs and their inhibitors are regulated by epigenetic modifications and may play a role in rotator cuff tears.

Introduction

Rotator cuff degeneration is a very common orthopedic condition, and there are multiple factors that eventually lead to a full-thickness rotator cuff tear [1]. The incidence rate of degenerative rotator cuff tears increases with age; thus, such tears can become an increasingly prevalent clinical problem [2]. Surgical repair of tendon tears significantly improves pain and function; however, re-tearing of the rotator cuff is not an infrequent occurrence [2].

ANEXO 4 - Artigo publicado na revista *Clinics*

CLINICAL SCIENCE

The roles of Tenascin C and Fibronectin 1 in adhesive capsulitis: a pilot gene expression study

Carina Cohen,^{1,*} Mariana Ferreira Leal,^{1,11,*} Paulo Santoro Belangero,¹ Eduardo Antônio Figueiredo,¹ Marília Cardoso Smith,¹¹ Carlos Vicente Andreoli,¹ Alberto de Castro Pochini,¹ Moises Cohen,¹ Benno Ejnisman,¹ Flávio Faloppa¹

¹Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Ortopedia e Traumatologia, ¹¹Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Genética, São Paulo/SP, Brazil.

OBJECTIVES: We evaluated mRNA expression levels of genes that encode TGF- β 1; the TGF- β 1 receptor; the collagen-modifying enzymes LOX, PLOD1, and PLOD2; and the extracellular matrix proteins COMP, FN1, TNC and TNXB in synovial/capsule specimens from patients with idiopathic adhesive capsulitis. Possible associations between the measured mRNA levels and clinical parameters were also investigated.

METHODS: We obtained glenohumeral joint synovium/capsule specimens from 9 patients with idiopathic adhesive capsulitis who had not shown improvement in symptoms after 5 months of physiotherapy. Adhesive capsulitis was confirmed in all patients by magnetic resonance imaging. We also obtained specimens from 8 control patients who had undergone surgery for acute acromioclavicular joint dislocation and who had radiological indication of glenohumeral capsule alteration based on arthroscopic evaluation. mRNA expression in the synovium/capsule specimens was analyzed by quantitative reverse transcription PCR. The *B2M* and *HPRT1* genes were used as references to normalize target gene expression in the shoulder tissue samples.

RESULTS: The synovium/capsule samples from the patients with adhesive capsulitis had significantly higher *TNC* and *FN1* expression than those from the controls. Additionally, symptom duration directly correlated with expression of *TGF β 1 receptor 1*.

CONCLUSION: Elevated levels of *TNC* and *FN1* expression may be a marker of capsule injury. Upregulation of *TGF β 1 receptor 1* seems to be dependent on symptom duration; therefore, *TGF β* signaling may be involved in adhesive capsulitis. As such, *TNC*, *FN1* and *TGF β 1 receptor 1* may also play roles in adhesive capsulitis by contributing to capsule inflammation and fibrosis.

KEYWORDS: Adhesive Capsulitis; Glenohumeral Capsule; Gene Expression; Extracellular Matrix; *TGF β 1* Signaling.

Cohen C, Leal MF, Belangero PS, Figueiredo EA, Smith MC, Andreoli CV, et al. The roles of Tenascin C and Fibronectin 1 in adhesive capsulitis: a pilot gene expression study. *Clinics*. 2016;71(6):325-331

Received for publication on December 15, 2015; First review completed on February 5, 2016; Accepted for publication on March 21, 2016

*Corresponding author. E-mail: mariana.morf@epm.br

¹¹contributed equally to this work

INTRODUCTION

Adhesive capsulitis, or frozen shoulder, is a debilitating condition in which patients present limited active and passive glenohumeral motion. Adhesive capsulitis occurs in 3%-5% of the general population (1) and the main cause of the painful restriction of movement is inflammatory

contracture of the joint capsule. The initial inflammation seems to lead to capsular fibrosis, stiffness and pain (2). Therefore, it has been hypothesized that similarities exist between adhesive capsulitis and the fibrous contractures that occur in Dupuytren disease (3,4). However, the molecular mechanism responsible for the underlying glenohumeral capsule inflammation and fibrosis is poorly understood.

Rodeo et al. suggested that cytokines, such as transforming growth factor beta (TGF β), may be involved in the inflammatory and fibrotic processes that occur in adhesive capsulitis. These cytokines may cause abnormal regulation of collagen expression and augment fibroblast proliferation (5). Therefore, TGF β acts as a persistent stimulus that leads to capsular fibrosis.

TGF β induces fibroblasts to synthesize, remodel and contract extracellular matrix (ECM), making this cytokine a

Copyright © 2016 CLINICS - This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium or format, provided the original work is properly cited.

No potential conflict of interest was reported.

DOI: 10.6061/clinics/2016/06/07

ANEXO 5 - Artigo publicado na revista *Connective Tissue Research*

Connective Tissue Research

ISSN: 0300-8207 (Print) 1407-8438 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ctc20>

Differential expression of extracellular matrix genes in glenohumeral capsule of shoulder instability patients

Paulo Santoro Belangero, Mariana Ferreira Leal, Eduardo Antônio Figueiredo, Carina Cohen, Carlos Vicente Andreoli, Marília Cardoso Smith, Alberto de Castro Pochini, Benno Ejnisman & Moises Cohen

To cite this article: Paulo Santoro Belangero, Mariana Ferreira Leal, Eduardo Antônio Figueiredo, Carina Cohen, Carlos Vicente Andreoli, Marília Cardoso Smith, Alberto de Castro Pochini, Benno Ejnisman & Moises Cohen (2016): Differential expression of extracellular matrix genes in glenohumeral capsule of shoulder instability patients, *Connective Tissue Research*, DOI: 10.3109/03008207.2016.1173034

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/03008207.2016.1173034>



Accepted author version posted online: 19 Apr 2016
Published online: 19 Apr 2016



Submit your article to this journal [CF](#)



Article views: 14



View related articles [CF](#)



View Crossmark data [CF](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ctc20>

ANEXO 6 - Artigo publicado na revista *Journal of Orthopaedic Research*

Expression Analysis of Genes Involved in Collagen Cross-Linking and Its Regulation in Traumatic Anterior Shoulder Instability

Paulo Santoro Belangero,¹ Mariana Ferreira Leal,^{1,2} Carina Cohen,¹ Eduardo Antonio Figueiredo,² Marília Cardoso Smith,² Carlos Vicente Andreoli,¹ Alberto de Castro Pochini,¹ Benno Ejnisman,¹ Moises Cohen¹

¹Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo 04038-031, Brazil, ²Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo 04023-001, Brazil

Received 24 March 2015; accepted 14 July 2015

Published online 4 August 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jor.22984

ABSTRACT: The molecular alterations involved in the capsule deformation presented in shoulder instability patients are poorly understood. Increased TGF β 1 acts as a signal for production of matrix macromolecules by fibrogenic cells at joint injury sites. TGF β 1, through its receptor TGF β R1, regulates genes involved in collagen cross-linking, such as LOX, PLOD1, and PLOD2. We evaluated TGF β 1, TGF β R1, LOX, PLOD1, and PLOD2 gene expression in the antero-inferior (macroscopically injured region), antero-superior and posterior regions of the glenohumeral capsule of 29 shoulder instability patients and eight controls. We observed that PLOD2 expression was increased in the anterior-inferior capsule region of the patients compared to controls. LOX expression tended to be increased in the posterior portion of patients. Patients with recurrent shoulder dislocation presented upregulation of TGF β R1 in the antero-inferior capsule portion and of PLOD2 in the posterior region. Conversely, LOX was increased in the posterior portion of the capsule of patients with a single shoulder dislocation episode. In the antero-inferior, LOX expression was inversely correlated and TGF β R1 was directly correlated with the duration of symptoms. In the posterior region, PLOD2, TGF β 1, and TGF β R1 were directly correlated with the duration of symptoms. In conclusion, PLOD2 expression was increased in the macroscopically injured region of the capsule of patients. Upregulation of TGF β 1, TGF β R1, and PLOD2 seems to be related with the maintenance of disease symptoms, especially in the posterior region. LOX upregulation seems to occur only in the initial phase of the affection. Therefore, TGF β 1, TGF β R1, LOX, and PLOD2 may play a role in shoulder instability. © 2015 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res* 34:510–517, 2016

Keywords: shoulder instability; gene expression; TGF β 1 signaling; collagen cross-linking

Shoulder dislocation is a common reason for emergency room visits and accounts for about 45% of all dislocations.¹ Traumatic shoulder dislocations are far more common than intentional and/or non-traumatic forms, which are managed by rehabilitation therapy and are not considered herein. Anterior shoulder dislocations contribute 96–98% of all shoulder dislocations.¹ The incidence of first-time anterior shoulder dislocation ranges from 8 to 8.2/100,000 population/year and the prevalence is about 2%.¹ Shoulder instability (SI) is often observed after the initial episode of shoulder dislocation, with a recurrence rate of up to 100% in young athletes.^{2,3}

Wound healing is a complex process that requires deposition and accumulation of newly synthesized structural proteins as well as degradation of old or damaged structures composed mainly of the extracellular matrix (ECM).⁴ In a previous study, we observed deregulated expression of collagen genes across the capsule of patients with traumatic anterior shoulder instability.⁵ The expression of collagen genes were increased in the antero-inferior (AI), antero-superior (AS), and posterior (P) portions of the capsule in

patients compared to controls. These molecular alterations may have a role in collagen fibril structure and in the tissue healing process.

An inflammatory response commonly occurs in the earliest phase of wound healing, followed by new connective tissue matrix deposition.⁶ Increases of transforming growth factor β 1 (TGF β 1) accompany the acute inflammatory phase and appear to act as a signal modulating the production of matrix macromolecules by fibrogenic cells at the injury site.⁷ The TGF β is activated by proteolytic cleavage.⁸ This activity is mediated by 2 signaling receptors, TGF β receptor 1 (TGF β R1) and TGF β receptor 2 (TGF β R2), which dimerize and transduce their signal via their serine threonine kinase activity.⁹ TGFBR1 is the central propagator of TGF β signaling.¹⁰

In the shoulder capsule of patients with adhesive capsulitis, TGF β was associated with fibrosis and accumulation of a dense matrix of type I and type III collagen within the capsule.^{11,12} Moreover, several studies reported similar molecular alterations in adhesive capsulitis and Dupuytren disease. In Dupuytren disease, the increased expression of TGF β 1 and its receptor TGFBR1 has previously been described.^{13,14}

TGF β 1 regulates important collagen-modifying enzymes, such as the lysyl oxidase (LOX)¹⁵ and lysyl hydroxylases 1 and 2 (encoded by PLOD1 e PLOD2 genes, respectively).^{16–18} LOX plays a key role in the maturation of the ECM. LOX is a secreted, copper-dependent amine oxidase which plays a substantial role in the biogenesis of the connective tissue matrix by oxidizing lysine residues in elastin and collagen, thereby initiating the formation of covalent cross-links

Paulo Santoro Belangero and Mariana Ferreira Leal contributed equally to this study.

Conflict of interest: None.

Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ); MC and MACS; Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); MC and MFL).

Correspondence to: Mariana Ferreira Leal (T: +55-11-55716621; F: +55-11-55716621; E-mail: mariana.mor@epm.br)

© 2015 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc.

ANEXO 7 - Artigo publicado na revista *PLOS ONE*

RESEARCH ARTICLE

Identification of Suitable Reference Genes for Gene Expression Studies in Tendons from Patients with Rotator Cuff Tear

Mariana Ferreira Leal^{1,2*}, Paulo Santoro Belangero¹, Eduardo Antônio Figueiredo¹, Carina Cohen¹, Leonor Casilla Loyola^{1,2}, Carlos Vicente Andreoli¹, Marília Cardoso Smith², Alberto de Castro Pochini¹, Benno Eijnisman¹, Moises Cohen¹

1 Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **2** Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

* mariana.morfi@epm.br



OPEN ACCESS

Citation: Leal MF, Belangero PS, Figueiredo EA, Cohen C, Loyola LC, Andreoli CV, et al. (2015) Identification of Suitable Reference Genes for Gene Expression Studies in Tendons from Patients with Rotator Cuff Tear. *PLoS ONE* 10(3): e0118821. doi:10.1371/journal.pone.0118821

Academic Editor: Alessandro D'Alì, Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, CANADA

Received: September 5, 2014

Accepted: January 9, 2015

Published: March 13, 2015

Copyright: © 2015 Leal et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, MC and MCS) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: LCL, MC and MFL) as grants and fellowships. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Rotator cuff tear is one of the most common causes of shoulder dysfunction. Gene expression analysis may be a useful tool for understanding tendon tears and the failure of cuff healing, and reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) has become an effective method for such studies. However, this technique requires the use of suitable reference genes for data normalization. Here, we evaluate the suitability of six reference genes (*18S*, *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* and *TBP*) using samples from the rotator cuff tendons of 28 individuals with tendon tears (3 tendons regions) and 8 controls (2 tendon regions); for the tear patients, we evaluated ruptured and non-ruptured tendon samples. The stability of the candidate reference genes was determined using the NormFinder, geNorm, BestKeeper and DataAssist software packages. Overall, *HPRT1* was the best single reference gene, and *HPRT1+TBP* composed the best pair and *HPRT1+TBP+ACTB* composed the best trio of reference genes from the analysis of different groups, including the simultaneous analysis of all tissue samples. To identify the optimal combination of reference genes, we evaluated the expression of *COL1A1* and *COL3A1*, and no obvious differences were observed when using 2, 3 or 4 reference genes for most of the analyses. However, *COL3A1* expression differed between ruptured and non-ruptured (posterior superior region) tendons of patients only when normalized by *HPRT1+TBP+B2M* and *HPRT1+TBP*. On the other hand, the comparison between these two groups using the best trio of reference genes (*HPRT1+TBP+ACTB*) and 4 reference genes did not revealed a significant difference in *COL3A1* expression. Consequently, the use of suitable reference genes for a reliable gene expression evaluation by RT-qPCR should consider the type of tendon samples investigated. *HPRT1+TBP+ACTB* seems to be the best combination of reference genes for the analysis of involving different tendon samples of individuals with rotator cuff tears.

ANEXO 8 - Artigo publicado na revista *PLOS ONE*

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE



Identification of Suitable Reference Genes for Gene Expression Studies of Shoulder Instability

Mariana Ferreira Leal^{1,2*}, Paulo Santoro Belangero¹, Carina Cohen¹, Eduardo Antônio Figueiredo¹, Leonor Casilla Loyola^{1,2}, Alberto Castro Pochini¹, Marília Cardoso Smith², Carlos Vicente Andreoli¹, Sintia Iole Belangero^{2,3}, Benno Ejnisman¹, Moises Cohen¹

1 Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Laboratório Interdisciplinar de Neurociência Clínica, Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Shoulder instability is a common shoulder injury, and patients present with plastic deformation of the glenohumeral capsule. Gene expression analysis may be a useful tool for increasing the general understanding of capsule deformation, and reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) has become an effective method for such studies. Although RT-qPCR is highly sensitive and specific, it requires the use of suitable reference genes for data normalization to guarantee meaningful and reproducible results. In the present study, we evaluated the suitability of a set of reference genes using samples from the glenohumeral capsules of individuals with and without shoulder instability. We analyzed the expression of six commonly used reference genes (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPR1*, *TBP* and *TFRC*) in the antero-inferior, antero-superior and posterior portions of the glenohumeral capsules of cases and controls. The stability of the candidate reference gene expression was determined using four software packages: NormFinder, geNorm, BestKeeper and DataAssist. Overall, *HPR1* was the best single reference gene, and *HPR1* and *B2M* composed the best pair of reference genes from different analysis groups, including simultaneous analysis of all tissue samples. GenEx software was used to identify the optimal number of reference genes to be used for normalization and demonstrated that the accumulated standard deviation resulting from the use of 2 reference genes was similar to that resulting from the use of 3 or more reference genes. To identify the optimal combination of reference genes, we evaluated the expression of *COL1A1*. Although the use of different reference gene combinations yielded variable normalized quantities, the relative quantities within sample groups were similar and confirmed that no obvious differences were observed when using 2, 3 or 4 reference genes. Consequently, the use of 2 stable reference genes for normalization, especially *HPR1* and *B2M*, is a reliable method for evaluating gene expression by RT-qPCR.

Citation: Leal MF, Belangero FS, Cohen C, Figueiredo EA, Loyola LC, et al. (2014) Identification of Suitable Reference Genes for Gene Expression Studies of Shoulder Instability. *PLoS ONE* 9(8): e105002. doi:10.1371/journal.pone.0105002

Editor: Tim Douglas Aumann, Flinders Institute of Neuroscience & Mental Health, Australia

Received: May 8, 2014; **Accepted:** July 15, 2014; **Published:** August 14, 2014

Copyright: © 2014 Leal et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; MC and MACS) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; MFL and MCG) as grants and fellowship awards. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: mariana.morf@epm.br

Introduction

Shoulder dislocation occurs in 1 to 2% of the population [1], and traumatic injuries account for 95% of shoulder dislocation episodes [2]. These shoulder injuries are frequently observed in young athletes that are involved in competitive sports [3], and shoulder instability (SI) is often observed after the initial episode of shoulder dislocation, with a recurrence rate of up to 100% in young athletes [4,5].

After episodes of shoulder dislocation, SI patients present plastic deformation of the glenohumeral capsule [6,7]. Although the antero-inferior (AI) region of the capsule is the most frequently injured site [7,8], previous macroscopic analysis of the collagen fiber bundle architecture in the AI region of the glenohumeral capsule revealed that a system of bundles spirally crossing one another permits the entire capsule to resist tensile and shear loads

[9]. As a result, there is a reciprocal load-sharing relationship within the capsule whereby tensile load in either the anterior or superior structures is concomitant with laxity in the posterior (P) or inferior portion, respectively [7], suggesting that different portions of the capsule may be modified in traumatic anterior SI cases.

Currently, little is known about capsule biology, especially in patients with SI. An improved understanding of the underlying biology will be important for guiding patient management and development of new therapeutic options that will be complementary to surgery. Our group recently began investigating alterations in gene expression in SI, as gene expression analysis has previously been used to increase understanding of the molecular events involved in other traumatic sport injuries such as ligament [10,11] and tendon injuries (for a review, see [12]).

As a result of its accuracy, sensitivity and capacity for high throughput analysis, reverse-transcription quantitative polymerase

ANEXO 9 - Artigo publicado na revista *Journal of Orthopaedic Research*

Gene Expression Analysis in Patients With Traumatic Anterior Shoulder Instability Suggests Deregulation of Collagen Genes

Paulo Santoro Belangero,¹ Mariana Ferreira Leal,^{1,2} Eduardo Antônio Figueiredo,² Carina Cohen,¹ Alberto de Castro Pochini,¹ Marília Cardoso Smith,² Carlos Vicente Andreoli,¹ Sirtia Iole Belangero,^{2,3} Benno Ejnisman,^{2,3} Moises Cohen¹¹Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, Rua Borges Lagoa, 783 CEP: 04038-031, São Paulo, SP, Brazil, ²Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, 04023-001, São Paulo, SP, Brazil, ³Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas, Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal de São Paulo, 04039-032, São Paulo, SP, Brazil

Received 20 March 2014; accepted 10 June 2014

Published online 11 July 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jor.22680

ABSTRACT: Shoulder dislocation occurs in 1–2% of the population. Capsular deformation is a key factor in shoulder dislocation; however, little is known about capsule biology. We evaluated, for the first time in literature, the expression of *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* and *COL5A1* in the antero-inferior, antero-superior and posterior regions of the glenohumeral capsule of 31 patients with anterior shoulder instability and eight controls. The expression of collagen genes was evaluated by quantitative reverse transcription-PCR. The expression of *COL1A1*, *COL3A1* and the ratio of *COL1A1*/*COL1A2* were increased in all three portions of the capsule in patients compared to controls ($p < 0.05$). *COL1A2* expression was upregulated in the antero-superior and posterior sites of the capsule of patients ($p < 0.05$). The ratio of *COL1A2*/*COL3A1* expression was reduced in capsule antero-inferior and posterior sites of patients compared to controls ($p < 0.05$). In the capsule antero-inferior site of patients, the ratios of *COL1A1*/*COL5A1*, *COL1A2*/*COL5A1* and *COL3A1*/*COL5A1* expression were increased ($p < 0.05$). In patients, *COL1A1*/*COL5A1* was also increased in the posterior site ($p < 0.05$). We found deregulated expression of collagen genes across the capsule of shoulder instability patients. These molecular alterations may lead to modifications of collagen fibril structure and impairment of the healing process, possibly with a role in capsular deformation. © 2014 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res* 32:1311–1316, 2014.

Keywords: shoulder instability; glenohumeral capsule; gene expression; extracellular matrix; collagen

Shoulder dislocation occurs in 1–2% of the population.¹ Traumatic injuries account for 95% of shoulder dislocation episodes.² These shoulder injuries are frequently observed in young athletes involved in competitive sports.³ In addition, after a first episode of anterior shoulder dislocation, shoulder instability is frequently observed and the recurrence rate is up to 100% in young athletes.^{4,5}

The anterior glenohumeral joint capsule is affected in 90% of shoulder dislocations.⁶ After a traumatic shoulder dislocation, patients present a plastic deformation of the capsule, which results in capsular laxity.^{7,8} The antero-inferior (AI) region of the capsule is the site most often injured.^{9,10} AI capsular deformation is described as the real pathogenic pattern of the shoulder dislocation.¹⁰ However, little is known about the capsule biology, especially in patients with shoulder instability. An improved understanding of the underlying biology is important to guide patient management and to develop new therapeutic options complementary to surgery.

The capsule is composed of cellular and fibrous elements. The collagenous content of the capsule progressively increases during development and it is generally fibrous at full term.¹¹ Type I, III, and V fibrillar collagens are the most common types present in the shoulder capsule.¹² Mutations in genes encoding

the collagens have been identified in most forms of Ehlers–Danlos syndrome (EDS) and osteogenesis imperfecta,^{13–15} which present frequent joint dislocations, including dislocations of the shoulder. Thus, alterations in these genes may also play a role in shoulder instability.

We hypothesized that gene expression alterations may arise as a result of shoulder dislocation and might be a contributor to recurrent dislocation episodes. Therefore, we evaluated, for the first time in literature, the expression of *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, and *COL5A1* mRNA in three regions of the glenohumeral capsule in patients with traumatic anterior shoulder instability and controls.

METHODS

Patients

We evaluated 31 outpatients with traumatic anterior shoulder dislocation from São Paulo Hospital of the Federal University of São Paulo (UNIFESP), Brazil. All patients were treated for at least 2 weeks with shoulder immobilization after the first episode of shoulder dislocation and underwent arthroscopic surgical treatment for shoulder instability. The following inclusion criteria were employed: positive apprehension test, a Bankart lesion on magnetic resonance imaging and no history of previous surgery for an injured shoulder. Patients with clinical signs of posterior and/or multidirectional instability or presenting generalized joint hyperlaxity or hypermobility by Beighton score¹⁶ were excluded. Moreover, patients with associated lesions, such as superior lesion anterior posterior (SLAP) lesions detected during the surgery, were excluded.

In addition, eight subjects who underwent arthroscopically assisted treatment for acromioclavicular dislocation were included as a control group. These patients did not

Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ); Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Correspondence to: Mariana Ferreira Leal (T: +55-11-55716621; F: +55-11-55716621; E-mail: mariana.mor@epm.br)

© 2014 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc.

Os próximos artigos apresentados, não relacionados à linha de pesquisa, foram publicados durante o período da pós-graduação.

ANEXO 10 - Artigo publicado na Revista Brasileira de Ortopedia

RBO-1062217; No. of Pages 4
ARTICLE IN PRESS

REV BRAS ORTOP. 2018; XXX(XX): XXX-XXX



SBOT
SOCIEDADE BRASILEIRA DE
ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA



RBO
REVISTA BRASILEIRA DE ORTOPEDIA
www.rbo.org.br



RBO

Relato de Caso

Ruptura parcial do tríceps distal em atleta: relato de caso e descrição de técnica cirúrgica[☆]

Eduardo Antônio Figueiredo, Paulo Henrique Schmidt Lara*, Gyoguevara Patriota, Ronaldo Roncetti Júnior, Paulo Santoro Belangero e Benno Ejnisman

Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Escola Paulista de Medicina (EPM), Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:
Recebido em 24 de outubro de 2017
Aceito em 9 de novembro de 2017
On-line em xxx

Palavras-chave:
Traumatismos em atletas
Traumatismos dos tendões
Ruptura

Keywords:
Athletic injuries
Tendon injuries
Rupture

R E S U M O

A ruptura do tendão do tríceps braquial corresponde a menos de 1% de todas as rupturas tendíneas nos membros superiores. As rupturas parciais são subdiagnosticadas, o que pode fazer com que uma ruptura parcial tome-se total. As rupturas completas geralmente requerem tratamento cirúrgico, entretanto para rupturas parciais não há uma conduta bem definida. Este artigo apresenta um caso de um atleta masculino de jiu-jitsu de 42 anos com ruptura parcial do tríceps braquial submetido a tratamento cirúrgico devido à persistência de perda de força de extensão do cotovelo, mesmo após tratamento conservador. Foi feito o reparo com enxerto de tendão do músculo palmar longo com técnica desenvolvida pelos autores. Não foram observadas complicações e o paciente apresentou resultado satisfatório, comprovado pela melhoria nos parâmetros dos estudos isocinéticos, os quais foram aferidos antes da cirurgia e com cinco meses de pós-operatório. Essa técnica demonstrou ser uma opção para casos de ruptura parcial do tríceps braquial em pacientes com alta demanda física que não apresentaram melhoria com o tratamento conservador.

© 2018 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Partial rupture of the distal triceps in an athlete: case report and description of surgical technique

A B S T R A C T

Brachial triceps tendon ruptures account for less than 1% of all tendinous ruptures in the upper limbs. Partial ruptures are underdiagnosed, which may cause a partial rupture to become total. Complete ruptures usually require surgical treatment; however, for partial ruptures there is no well-defined conduct. This article presents a case of a 42-year-old male

[☆] Trabalho desenvolvido no Centro de Traumatologia do Esporte, Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Escola Paulista de Medicina (EPM), Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.
E-mail: phalura@gmail.com (P.H. Lara).
<https://doi.org/10.1016/j.rbo.2017.11.007>

0102-3616/© 2018 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Como citar este artigo: Figueiredo EA, et al. Ruptura parcial do tríceps distal em atleta: relato de caso e descrição de técnica cirúrgica. Rev Bras Ortop. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rbo.2017.11.007>

ANEXO 11 - Artigo publicado na Revista Brasileira de Ortopedia

REV BRAS ORTOP. 2018; 53(2): 171-175



Original article

Displaced midshaft clavicle fracture in athletes – should we operate?☆



Neydson André Solposto Marques de Souza*, Paulo Santoro Belangero,
Eduardo Antônio de Figueiredo, Alberto de Casto Pochini, Carlos Vicente Andreoli,
Benno Ejnisman

Centro de Traumatologia do Esporte, Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 October 2016
Accepted 6 February 2017
Available online 15 February 2018

Keywords:
Fractures, bone
Clavicle
Bone plates
Athletes

ABSTRACT

Objective: To assess the results of the treatment of fractures of the middle third of the clavicle with a pre-contoured plate in athletes.

Methods: The authors performed 26 osteosyntheses in 25 patients with fractures of the middle third of the clavicle. The fractures were classified according to Robinson as 16 type B1 and ten type B2. The mean age was 37 years, ranging from 15 to 63 years, 20 patients were male and five were female, and all play sports in an amateur or professional manner. All patients were operated on in the acute phase of fracture within five days after trauma. Patients were treated with open reduction and internal fixation using pre-contoured plates. The technique and the implant used were the same, but the time of immobilization and rehabilitation protocol were individualized for each patient according to physical activity. Mean follow-up was 16.8 months (6–48 months), with return to sport activities in 45.6 days. **Results:** Functional assessment was performed using the University of California at Los Angeles (UCLA) score. The results averaged 34.07 of 35 points. No cases presented nonunion. Only one complication was observed (thrombosis of the subclavian vein with good response to conservative treatment); two patients required implant removal.

Conclusion: The surgical treatment of clavicle fractures in athletes presented satisfactory functional outcome and early return sport.

© 2017 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

☆ Study conducted at Centro de Traumatologia do Esporte, Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

* Corresponding author.

E-mail: dr.nasouza@gmail.com (N.A. Souza).

<https://doi.org/10.1016/j.rboe.2018.02.002>

2255-4971/© 2017 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ANEXO 12 - Artigo publicado na Revista Brasileira de Ortopedia

REV BRAS ORTOP. 2017;52(2): 948-953



Original article

Acute distal biceps ruptures: single incision repair by use of suture anchors[☆]



Rafael Almeida Maciel*, Priscilla Silva Costa, Eduardo Antônio Figueiredo, Paulo Santoro Belangero, Alberto de Castro Pochini, Benno Ejnisman

Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Centro de Traumatologia do Esporte, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2016

Accepted 31 May 2016

Available online 9 March 2017

Keywords:

Elbow/surgery

Elbow/injuries

Treatment outcome

ABSTRACT

Objective: Clinical and functional assessment of the surgical treatment for acute injury of the distal insertion of the biceps brachial performed with a surgical technique using a single incision in proximal forearm and fixation with suture anchors in the radial tuberosity.

Methods: This study reviewed the medical records of patients who underwent surgical treatment of distal biceps injury during the period between January 2008 and July 2014. In a mean follow-up of 12 months, 22 patients with complete and acute injury, diagnosed through physical examination and imaging studies, were functionally assessed in the postoperative period regarding the range of motion (degrees of flexion-extension and pronation-supination), the presence of pain (VAS), the Andrews-Carson-score, and the Mayo Elbow Performance Score (MEPS).

Results: During the postoperative follow-up assessment, no patient reported pain by VAS scale; all were satisfied with the esthetic appearance of the surgery. The range of articular movement remained unchanged at 95.4% of patients, with the loss of 8° of supination in one patient. No changes in muscle strength were observed. The results of the Andrews-Carson score were good in 4.6% and excellent in 95.4% of cases; the MEPS presented 100% of excellent results. The rate of complications was 27.2%, similar to the literature.

Conclusion: Surgical repair of acute injury of the distal biceps through a single incision in the proximal forearm and fixation with two suture anchors in the radial tuberosity is an effective and safe therapeutic option, allowing early motion and good functional results.

© 2016 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

[☆] Study conducted at the Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Centro de Traumatologia do Esporte, Grupo de Ombro e Cotovelo, São Paulo, SP, Brazil.

* Corresponding author.

E-mail: rafaelalmeidamaciel@gmail.com (R.A. Maciel).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rboe.2017.03.004>

2255-4971/© 2016 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Descritores em Ciências da Saúde: DeCS [Internet]. ed. 2017. São Paulo (SP): BIREME / OPAS / OMS. 2017 [atualizado 2017 Mai; citado 2017 Jun 13]. Disponível em: <http://decs.bvsalud.org>

Academia Brasileira de Letras. Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa. 5 ed. São Paulo: Global, 2016. 976 p.

Novak Eduardo Murilo, Giostri Giana Silveira, Nagai Alencar. Terminologia Anatômica em Ortopedia. *Rev. bras. ortop.* 2008 Apr; 43(4): 103-107.

Pereira TA. Terminologia DeCS e as novas regras ortográficas da língua portuguesa: orientações para uma atualização. *Acta Cir Bras.* [Internet]. 2012 July [cited 2018 May 12];27(7):509-14. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010286502012000700014&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S010286502012000700014>