

PEDRO AUGUSTO PONTIN

**Análise de polimorfismos nos receptores de estrogênio alfa
e beta em mulheres pós-menopáusicas com tendinopatia
do tendão do músculo tibial posterior**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leme
Godoy dos Santos

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pontin, Pedro Augusto

Análise de polimorfismos nos receptores de estrogênio alfa e beta em
mulheres pós-menopáusicas com tendinopatia do tendão do músculo tibial
posterior/ Pedro Augusto Pontin. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Alexandre Leme Godoy dos Santos.

Descritores: 1.Pé plano 2.Tendinopatia 3.Disfunção do tendão tibial
posterior 4.Estrogênios 5.Polimorfismo

USP/FM/DBD-482/16

À minha família: Jaime, Maria das Graças e Arthur.

À minha esposa, Isabela.

À minha filha, Giovana.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Tulio Diniz Fernandes, idealizador desse projeto, pelos ensinamentos e pelas oportunidades de crescimento profissional.

Ao Dr. Alexandre Leme Godoy dos Santos, meu orientador, pela confiança e pelo suporte para o desenvolvimento desse projeto.

Ao Dr. César de César Netto, grande amigo ao longo de quase 20 anos, agradecimento especial pelo apoio irrestrito e pela fundamental contribuição com suas análises críticas ao longo de toda a elaboração desse estudo.

À Prof. Dr. Kátia Cândido Carvalho e aos membros do LIM-58 da FMUSP, pelo apoio, pela fundamental contribuição e pela intensa dedicação para a realização desse projeto.

Ao Dr. Fernando Brandão de Andrade e Silva, pela essencial participação na fase final desse projeto.

Ao Profs. Drs. Edmund Chada Baracat e José Maria Soares Júnior, pela participação e pelo suporte nesse projeto de pesquisa.

Aos Drs. Marcos de Andrade Corsato, Marcos Hideyo Sakaki, Rafael Trevisan Ortiz, Rafael Barban Sposeto e Bruno Sérgio Ferreira Massa, membros do Grupo do Tornozelo e Pé do IOT-HCFMUSP, pelo companheirismo durante as atividades conjuntas ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Aos residentes do Grupo do Pé do IOT-HCFMUSP de 2013 a 2016, em especial, ao Dr. Fábio Fonseca, pela participação e contribuição para a viabilização desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo auxílio concedido, fundamental para o suporte financeiro nas diversas etapas desse projeto.

À Tania Borges e Rosana Costa, secretárias da pós-graduação do IOT-HCFMUSP, por todo o suporte e pela eficiência durante todo o programa.

A todas pacientes participantes, por aceitarem fazer parte dessa pesquisa contribuindo com o enriquecimento do conhecimento científico.

Ao Sr. José Afonso Pontin, meu tio, pela sua essencial contribuição na conclusão desse projeto.

Ao Dr. Gustavo Damásio Magliocca, amigo e grande parceiro nas fases importantes de minha vida.

A toda minha família, sogros, cunhados, afilhados e amigos, por contribuírem para que os dias sejam ricos em felicidade.

À minha esposa Isabela, por todo o amor, pela cumplicidade, pelo apoio incondicional e pelo exemplo de caráter. Certamente, sem você, nada disso seria possível.

E à minha filha, Giovana, meu amor, razão do meu viver, fonte de inspiração e de superação.

*"O período de maior ganho em
conhecimento e experiência é o período mais
difícil da vida de alguém".*

Dalai Lama

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Objetivos.....	4
1.1.1 Objetivo primário	4
1.1.2 Objetivos secundários.....	4
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 Os tendões	6
2.2 A disfunção do tendão do músculo tibial posterior	9
2.2.1 Anatomia e função do músculo tibial posterior	9
2.2.2 Quadro clínico e classificação da disfunção do tendão tibial posterior	10
2.2.3 Fisiopatogenia da disfunção do tendão do músculo tibial posterior	12
2.3 O estrogênio e seus receptores celulares.....	15
2.4 A influência do estrogênio no metabolismo tendíneo.....	21
2.5 Os polimorfismos genéticos.....	25
2.5.1 Conceito.....	25
2.5.2 Os polimorfismos dos genes dos receptores estrogênicos	27
2.5.2.1 SNP <i>PvuII</i> e <i>XbaI</i> do receptor de estrogênio alfa.....	27
2.5.2.2 SNP <i>AluI</i> do receptor de estrogênio beta.....	27
2.5.3 Os polimorfismos e as tendinopatias	28
3 MÉTODOS.....	36
3.1 Desenho do estudo.....	36
3.2 Aprovação da Comissão de Ética e termo de consentimento	36
3.3 Critérios de seleção	37
3.3.1 Critérios de inclusão.....	37

3.3.2 Critérios de não inclusão	38
3.3.3 Critérios de exclusão.....	38
3.4 Formação dos grupos de estudo	38
3.5 Coleta de informações, exame clínico e de imagem, obtenção das amostras e extração do ADN e avaliação dos desfechos.	39
3.5.1 Extração do ADN.....	41
3.5.2 Amplificação dos fragmentos e Polimerase chain reaction – Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)	42
3.5.3 Avaliação dos desfechos	45
3.6 Cálculo da amostra.....	45
3.7 Cegamento	45
3.8 Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> (EHW).....	46
3.9 Análise estatística.....	46
4 RESULTADOS	49
4.1 Análise da população estudada	49
4.1.1 Fluxo dos pacientes	49
4.1.2 Avaliação dos dados demográficos e características clínicas	50
4.1.3 Equilíbrio Hardy-Weinberg (EHW)	52
4.2 Genotipagem	52
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÕES.....	64
7 ANEXOS.....	66
7.1 Anexo A - Comissão Científica do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o protocolo nº 971.....	66
7.2 Anexo B - Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o nº 10166-2013	67
7.3 Anexo C - Termo de outorga do auxílio Fapesp.....	68
7.4 Anexo D - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	70
7.5 Anexo E - Protocolo de Purificação do ADN - QiAamp®DNA Mini and Blood Mini Handbook (2ª edition, dec 2007, <i>Qiagen Sample & Assay Technologies</i> - pp. 27-29).....	74
7.6 Anexo F - Protocolos de Digestão para enzimas Thermoscientific (sem adição do tampão SAM):.....	75
8 REFERÊNCIAS	77

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	percentagem
°C	graus Celsius
chr	cromossomo
cm	centímetro
ADN	ácido desoxirribonucleico
AF	Fator de ativação
ARN	ácido ribonucleico
ARN _m	ácido ribonucleico mensageiro
Col	colágeno
CO	contraceptivo oral
DP	desvio padrão
DTTP	disfunção do tendão tibial posterior
EHW	equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
ERE	elemento de resposta ao estrogênio
FGF	fator de crescimento fibroblasto
g	grama
h	hora
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA	antígeno leucocitário humano
Hsp	proteína estabilizadora de choque térmico
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IMC	índice de massa corpórea
IOT-USP	Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Universidade de São Paulo
kg	quilograma
MEC	matriz extracelular
mm	milímetro

MMP	metaloproteinase da matriz
pb	pares de base
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RE	receptor estrogênico
RE1	receptor estrogênico alfa
RE2	receptor estrogênico beta
RFLP	<i>restriction fragment lenght polymorphism</i>
RM	ressonância magnética
RMR	rotura do manguito rotador
RXFP	receptores da relaxina
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
STR	<i>short tandem repeat</i>
TNC	tenascina
TRH	terapia de reposição hormonal
TP	músculo tibial posterior
TTP	tendão do músculo tibial posterior
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação gráfica da estrutura anatômica básica do tendão da estrutura básica histológica do tendão.....	7
Figura 2 -	Estrutura anatômica do músculo e tendão tibial posterior.	9
Figura 3 -	Representação gráfica da localização do gene que codifica o RE1 no cromossomo 6 e o RE2 no cromossomo 14.	17
Figura 4 -	Representação gráfica da estrutura dos domínios funcionais dos RE.....	18
Figura 5 -	Representação gráfica do Modelo da ação do estrogênio na via do Receptor de Estrogênio.	20
Figura 6 -	Representação gráfica da estrutura do gene que codifica o RE1, dos seus domínios funcionais e a localização dos respectivos polimorfismos. Éxons codificantes são representados por quadrados.....	27
Figura 7 -	Representação gráfica da estrutura do gene que codifica o RE2, dos seus domínios funcionais e a localização dos respectivos polimorfismos. Éxons codificantes são representados por quadrados.....	28
Figura 8 -	Avaliação clínica do alinhamento do pé (A e B) e das imagens axial (C,D), sagital (E) e coronal (F) da RM evidenciam rotura da substância e tenossinovite do TTP.	40
Figura 9 -	Gel de agarose 1% impregnado com brometo de etídio apresentando o perfil de migração dos produtos de PCR obtidos para RE1	42
Figura 10 -	Gel de agarose (2%) representativo do perfil de amplificação dos fragmentos de PCR para o polimorfismo <i>AluI</i> do RE2	43
Figura 11 -	Géis de agarose (2%) representativos do padrão de polimorfismo obtido na restrição com <i>XbaI</i> e <i>PvuII</i> de amostras amplificadas para o RE1.....	44
Figura 12 -	Gel de agarose (2%) representativo do padrão de polimorfismo obtido na restrição com <i>AluI</i> de amostras amplificadas para o RE2.....	44
Figura 13 -	Fluxograma das etapas do estudo.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Informações sobre os primers a serem utilizados na técnica de PCR e de RFLP.	43
Tabela 2	- Idade (anos) por grupo de estudo.	50
Tabela 3	- IMC por grupo de estudo.	50
Tabela 4	- Tempo de menopausa (meses) por grupo de estudo.	50
Tabela 5	- Duração da sintomatologia da doença (meses) para o grupo de mulheres com DTTP.	51
Tabela 6	- Frequência absoluta e relativa das variáveis qualitativas entre os grupos de estudo e os respectivos resultados do teste qui-quadrado.	51
Tabela 7	- Distribuição genotípica dos SNP <i>XbaI</i> , <i>PvuII</i> e <i>AluI</i> com verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg.	52
Tabela 8	- Frequência relativa e absoluta dos alelos por presença ou ausência da doença DTTP.	53
Tabela 9	- Frequência relativa e absoluta dos genótipos por presença ou ausência da doença DTTP.	53
Tabela 10	- Frequência relativa e absoluta dos genes por presença ou ausência da doença, e os respectivos resultados do OR bruto e ajustado.	55

RESUMO

Pontin PA. *Análise de polimorfismos nos receptores de estrogênio alfa e beta em mulheres pós-menopáusicas com tendinopatia do tendão do músculo tibial posterior* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: A disfunção do tendão tibial posterior (DTTP), principal causa de pé plano adquirido no adulto, é mais frequente em indivíduos do gênero feminino e apresenta pico de incidência na sexta década de vida. Diversos fatores de risco – intrínsecos e extrínsecos – e condições sistêmicas associadas são descritas na literatura. A predisposição genética resultante da maior expressão de genes relacionados ao metabolismo hormonal, principalmente do estrogênio, pode desempenhar influência na fisiopatogenia dessa lesão em associação aos fatores comportamentais e endógenos.

OBJETIVO: Analisar a frequência de polimorfismos nos genes dos receptores de estrogênio (RE) dos tipos alfa (RE1) e beta (RE2), em pacientes na pós-menopausa com diagnóstico de tendinopatia do tendão do músculo tibial posterior e em pacientes assintomáticas. **CASUÍSTICAS e MÉTODOS:** Foram incluídas 202 pacientes do gênero feminino (N=202), com idade superior a 40 anos, divididas em 2 grupos (n=101), de casos e controles. Foram definidos como casos pacientes na pós-menopausa com diagnóstico de DTTP, realizado por meio dos exames clínico e de imagem (RM), e, como controles, pacientes com as mesmas características epidemiológicas, assintomáticas, que apresentavam exames clínico e de imagem normais para a avaliação do tendão tibial posterior. Células epiteliais da mucosa bucal das pacientes incluídas no estudo foram coletadas por meio de bochecho com solução glicosada para extração e análise do **RESULTADOS:** Pacientes portadoras do genótipo xx do SNP *XbaI* apresentaram risco estimado 2,38 vezes maior ($p = 0,029$) de desenvolver a DTTP quando comparadas às portadoras dos genótipos selvagem ou heterozigoto. Já a distribuição dos genótipos dos SNP *PvuII* e *AluI* não apresentou associação com o desenvolvimento da doença. ADN genômico. Os SNP dos genes dos RE1 (*XbaI* e *PvuII*) e RE2 (*AluI*) foram avaliados com base em PCR-RFLP. **CONCLUSÃO:** O presente estudo demonstra que pacientes com polimorfismo *XbaI* do RE1 apresentam maior risco de desenvolvimento da disfunção do tendão tibial posterior.

Descritores: pé plano, tendinopatia, disfunção do tendão tibial posterior, estrogênio, polimorfismo.

ABSTRACT

Pontin PA. *Polymorphisms of alpha and beta estrogen receptors in postmenopausal women with posterior tibial tendon dysfunction* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

INTRODUCTION: Posterior tibial tendon dysfunction (PTTD), the most common cause of flatfoot deformity in adults, is more frequent in the female gender with peak incidence in the sixth decade of life. Multiple risk factors - intrinsic and extrinsic - and associated systemic conditions have been described in the literature. Genetic predisposition secondary to hyperexpression of genes related to hormonal metabolism, particularly the estrogens, may play a role in the pathogenesis of this disease acting in association with behavioral and endogenous risk factors. **OBJECTIVE:** The aim of this study was to analyze the frequency of polymorphisms of the estrogen receptors (ER) alpha (ER1) and beta (ER2) in postmenopausal women with PTTD when compared to asymptomatic control patients. **METHODS:** 202 female patients over the age of 40 were included in the study (N = 202). They were then divided into 2 different groups (n = 101): cases and controls. We defined as cases postmenopausal women with symptomatic PTTD, diagnosed by clinical and MRI examinations. Females with similar epidemiology, but clinically asymptomatic and with normal MRI evaluation for the posterior tibial tendon were defined as controls. Oral mucosa epithelial cells were collected from the patients and genomic DNA was extracted from the samples. The SNPs for the ER1 (XbaI and PvuII) and ER2 (AluI) genes were assessed by PCR-RFLP. **RESULTS:** Patients with SNP XbaI genotype xx had 2.38 higher estimated risk ($p = 0,029$) in developing PTTD, when compared to patients with the other genotypes. No associations were found for the SNP PvuII and AluI. **CONCLUSION:** The present study demonstrates that patients with the XbaI single nucleotide polymorphism of estrogen receptor 1 gene have higher risk of developing posterior tibial tendon dysfunction.

Descriptors: flatfoot, tendinopathy, posterior tibial tendon dysfunction, estrogen, polymorphism.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O pé plano adquirido do adulto tem como principal fator etiológico a disfunção do tendão tibial posterior (DTTP) (Mosier *et al.*, 1999). Estudos epidemiológicos revelaram que essa alteração tendínea é três vezes mais frequente no gênero feminino, acomete 3,3% a 10% desta parcela da população, e o pico de sua incidência ocorre aos 55 anos de idade (Kohls-Gatzoulis *et al.*, 2004; Kohls-Gatzoulis *et al.*, 2009). Além disso, é responsável por cerca de 16% das tendinopatias da região do tornozelo (Bare & Haddad, 2001), e afeta indivíduos com antecedentes e comorbidades clínicas, tais como doenças reumatológicas (Downey *et al.*, 1988; Myerson *et al.*, 1989), uso crônico de corticoesteroides, obesidade, diabetes mellitus e trauma prévio (Deland *et al.*, 2005).

O conhecimento de todos os fatores etiológicos envolvidos na fisiopatogenia da DTTP ainda permanece em investigação na literatura médica. Algumas dessas condições já são reconhecidas, como o impacto tendíneo no túnel osteofibroso retromaleolar (Bare & Haddad, 2001), a área hipovascularizada do tendão (Petersen *et al.*, 2002), a lesão dos tecidos moles mediais (Orr & Nunley, 2013) e deformidades ósseas congênitas (Holmes & Mann, 1992). Há pacientes que desenvolvem, no entanto, a DTTP na ausência de tais condições e de outras doenças sistêmicas pré-existentes, o que sugere a existência de fatores intrínsecos desconhecidos associados a esta degeneração.

Outras tendinopatias também apresentam diferenças de incidência relacionadas ao gênero e à idade. Mulheres, na fase reprodutiva, quando comparadas aos homens da mesma faixa etária, apresentam menor frequência tanto de tendinopatia de calcâneo (Cook *et al.*, 2007) quanto de ruptura daquele tendão (Huttunen *et al.*, 2014). Abate *et al.* (2014) constataram que há uma inversão dessa relação após a quinta e a sexta década, período coincidente com as fases da perimenopausa e menopausa,

e notaram maior prevalência de lesões tendíneas degenerativas no gênero feminino.

Diferenças nas propriedades biomecânicas e estruturais dos tendões relacionadas ao gênero também foram verificadas. Os homens apresentam tendões com maior diâmetro (Magnusson *et al.*, 2007) e flexibilidade (Sullivan *et al.*, 2009), quando comparados às mulheres. Esses resultados despertaram o interesse acerca da possível influência fisiológica dos hormônios sexuais femininos, principalmente do estrogênio, na composição e no metabolismo tendíneo.

Estudos recentes indicam que variações na concentração sérica do estrogênio estão relacionadas à maior prevalência de diferentes tendinopatias. Níveis séricos dentro da faixa de normalidade estão associados a menores taxas de produção de colágeno (Hansen, Miller, *et al.*, 2009), de reparação (Hansen *et al.*, 2008) e de resistência do tecido tendíneo (Bryant *et al.*, 2008).

Os estrogênios atuam por meio da ativação de seus receptores celulares específicos, os receptores de estrogênio (RE), principalmente o receptor estrogênico alfa (RE1) e o receptor estrogênico beta (RE2) (Kuiper *et al.*, 1996). Esses receptores possuem expressões teciduais heterogêneas (Kos *et al.*, 2001; Gruber *et al.*, 2002; Nilsson & Gustafsson, 2011) e Bridgeman *et al.* verificaram a presença de ambos os tipos de receptores no tendão do músculo Tibial Posterior (TTP) (Bridgeman *et al.*, 2010).

É conhecida na literatura a associação entre a expressão de polimorfismos dos genes codificadores do RE e a presença de processos patológicos. Alcazar *et al.* (2010) descreveram alterações nos sistemas cardiovascular, urogenital e vascular na presença dessas variações. Estudos mais recentes também comprovaram a influência desses polimorfismos no sistema musculoesquelético, em especial, na lesão do manguito rotador (Motta *et al.*, 2014; Teerlink *et al.*, 2015; Tashjian *et al.*, 2016). Até o presente momento, contudo, não há estudos que tenham avaliado a associação entre os polimorfismos genéticos dos RE e a DTTP.

Assim, a hipótese do presente estudo que ora se apresenta é que a presença dos polimorfismos dos genes codificantes dos receptores estrogênico alfa e beta influencia o desenvolvimento da DTTP em indivíduos do gênero feminino na pós-menopausa.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo primário

Verificar a associação entre a DTTP e a presença de polimorfismos nos genes codificadores dos receptores de estrogênio, tipos alfa e beta, em mulheres na pós-menopausa.

1.1.2 Objetivos secundários

Avaliar a frequência dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) *XbaI* e *PvuII* do gene codificante do RE1, por *polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP), em pacientes na pós-menopausa com diagnóstico de DTTP e em indivíduos sem a tendinopatia.

Avaliar a frequência do polimorfismo de nucleotídeo único *AluI* na do gene codificante do RE2, por PCR-RFLP, em pacientes na pós-menopausa com diagnóstico de DTTP e em indivíduos sem a tendinopatia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Os tendões

Os tendões são tecidos especializados que conectam o músculo ao osso e transmitem as forças que promovem o movimento articular. São compostos por fibras de colágeno, constituídas de moléculas solúveis de tropocolágeno, por meio de ligações cruzadas entre si, tornam-se insolúveis e se estruturam em microfibrilas. As microfibrilas, por sua vez, são agrupadas em fibrilas e fibras. O conjunto de fibras colágenas formam os fascículos, revestidos por uma fina membrana de tecido conectivo frouxo, denominada endotendão, que permite o deslizamento entre elas. Os fascículos são revestidos por outra membrana mais externa, denominada epitendão, que contém vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Docheva *et al.*, 2015).

Alguns tendões retilíneos não possuem bainha ao redor dessa composição anatômica, apenas uma fina camada de tecido conectivo, chamada paratendão. Já aqueles que alteram suas direções possuem uma bainha sinovial verdadeira, constituída por três camadas: a visceral, mais profunda e em contato direto com o tendão; a parietal, mais superficial e em contato com as superfícies ósseas; e o mesotendão, uma invaginação que comunica a bainha ao epitendão e serve de canal para o aporte vascular (Bare & Haddad, 2001). Entre elas, se forma uma cavidade, a qual é preenchida por um fluido rico em mucopolissacarídeos que provê lubrificação, minimiza o atrito entre as camadas e confere proteção ao tecido tendíneo (Kjaer *et al.*, 2009).

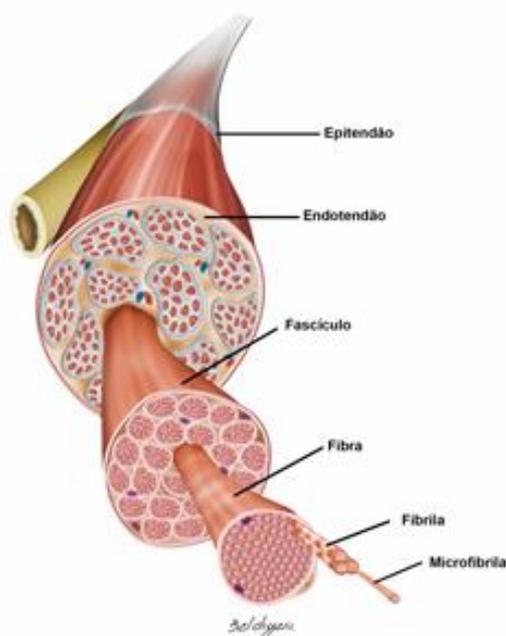


Figura 1 - Representação gráfica da estrutura anômica básica do tendão da estrutura básica histológica do tendão.

A matriz extracelular (MEC) tendínea é composta, basicamente, por água – entre 60-80% do peso total –, fibras colágenas e proteoglicanas. As fibras de colágeno tipo I predominam (95%) e correspondem a 65-80% do peso seco do tendão. O restante das fibras (5%) são compostas, principalmente, por colágeno tipo III e, em menor quantidade, pelos tipos V, VI, XII, XIV e XV (Bosman & Stamenkovic, 2003; Riley, 2004).

Os demais componentes da MEC são, essencialmente, as proteoglicanas – entre elas, decorina, agrecano, versincano e biglicano –, elastina, minerais, além de proteínas especializadas, como as glicoproteínas adesivas – fibronectina e a tenascina-C – ácido hialurônico, metaloproteases da matriz (MMPs) e seus inibidores (Kannus 2000; Bosman & Stamenkovic, 2003). As MMP são enzimas envolvidas em processos fisiológicos e têm capacidade de degradar, renovar e remodelar os componentes da MEC, principalmente o colágeno (Godoy-Santos *et al.*, 2014).

O componente celular é, em quase sua totalidade (95%), representado pelos tenoblastos – células imaturas, com alto potencial metabólico – e tenócitos – forma madura dos tenoblastos – os quais são arranjados em colunas paralelas ao eixo longo do tendão e permeados por fibras colágenas.

O restante (5%) se refere aos condrócitos, localizados nas regiões de compressão e inserção do tecido tendíneo, células epiteliais, vasculares e sinoviais (Abate *et al.*, 2009).

O componente celular do tendão produz a MEC, com pico de produção durante a maturidade e declínio no envelhecimento. A conversão do tenoblasto em tenócito responde a estímulos catabólicos, e otimiza a produção colágena e a remodelação da MEC (Chuen *et al.*, 2004).

O tecido tendíneo é também caracterizado por uma baixa taxa metabólica e necessita de até 50-100 dias para a reciclagem de seu componente colágeno. Apresenta, ainda, produção energética essencialmente anaeróbica: consome 7,5 vezes menos oxigênio quando comparado às células musculares. Essa característica confere menor risco de isquemia e necrose durante o *stress* da atividade à qual é submetido. Contudo, a reduzida atividade mitótica e a baixa celularidade determinam capacidade limitada de remodelamento e cicatrização (Vailas *et al.*, 1978).

Os tendões são divididos em três segmentos anatômicos distintos: junção miotendínea, mais proximal e localizada entre o ventre muscular e a substância tendínea, é a área que possui a maior inervação e vascularização e é submetida ao maior *stress* mecânico durante a contração muscular; a segunda porção se refere à substância, ou corpo do tendão. E, por fim, a junção osteotendínea – ou êntese – que representa a inserção do tendão no tecido ósseo (Abate *et al.*, 2009).

A fisiopatologia das tendinopatias é multifatorial e relacionada a fatores endógenos e exógenos. As alterações histopatológicas e moleculares encontradas nas tendinopatias – destruição da microarquitetura tendínea, desorganização das fibras colágenas, degeneração mixoide, metaplasia condroide, calcificações e neovascularização – resultam em alterações das características mecânicas do tecido tendíneo (Maffulli *et al.*, 2003; Gisslén & Alfredson, 2005; Xu & Murrell, 2008; Abate *et al.*, 2009).

2.2 A disfunção do tendão do músculo tibial posterior

2.2.1 Anatomia e função do músculo tibial posterior

O músculo tibial posterior tem origem no terço proximal do compartimento posterior da perna, na tíbia, na fíbula e na membrana interóssea. A sua porção miotendínea surge no terço distal da perna, na região pósteromedial, em que se forma o tendão que assume um trajeto descendente, posterior e medial ao eixo da articulação tibiotalar adjacente ao maléolo medial (Supple *et al.*, 1992). Nessa topografia, altera seu trajeto para anterior, adentra no retináculo dos flexores, onde permanece plantar e medial à articulação subtalar, e segue inferior à porção plantar do ligamento calcâneo-navicular (Figura 2). O tendão apresenta ampla área de inserção,

que inclui o sustentáculo do tálus, a tuberosidade medial do navicular, porções plantares dos cuneiformes medial, intermédio e lateral, cuboide e bases do segundo, terceiro e quarto metatarsos (Bare & Haddad, 2001).

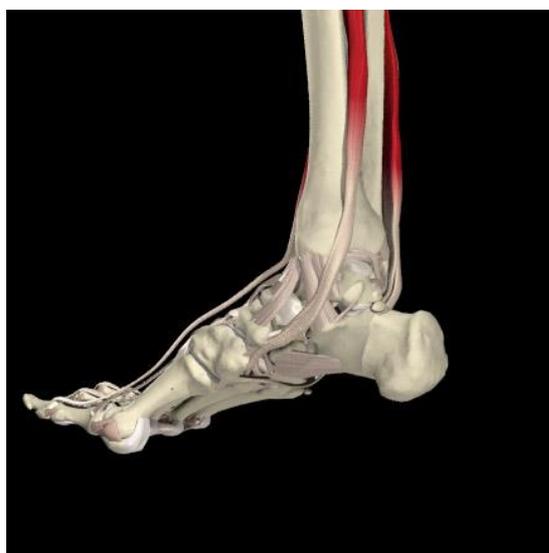


Figura 2 - Estrutura anatômica do músculo e tendão tibial posterior.

Diferentemente de outros tendões, a bainha do TTP não possui mesotendão, o que representa diminuição do suprimento vascular. A camada parietal da bainha está em contato direto com a superfície do túnel

osteofibroso do maléolo medial: mede cerca de 71 mm de comprimento no homem e 66 mm na mulher, e se estende por aproximadamente 45mm proximal e 26mm distal ao ápice do maléolo medial. Tem a função de otimizar o deslizamento do tendão e diminuir o atrito (Bare & Haddad, 2001).

O aporte sanguíneo do TTP é proveniente de ramos da artéria tibial posterior. Proximal ao maléolo medial, o tendão recebe os vasos sanguíneos do ventre muscular e da rede arterial do tecido conectivo peritendíneo; distalmente, as artérias provenientes da víncula triangular e dos vasos da inserção periosteal (Prado *et al.*, 2006). Existe uma zona hipovascular, de maior vulnerabilidade, no intervalo dessas áreas, a, aproximadamente, 14-15mm distal ao maléolo medial (Otis & Gage, 2001).

Durante o ciclo da marcha, após o contato do calcâneo com o solo, o TP contrai de maneira excêntrica, o que promove a desaceleração da eversão da articulação subtalar, impede o valgismo excessivo, provoca a inversão do retropé e consequente estabilização das articulações transversas do tarso. Dessa forma, atua como o principal estabilizador dinâmico do arco longitudinal medial do pé e inversor primário do retropé. Além disso, participa também como flexor plantar do tornozelo, na fase do desprendimento calcâneo. É, portanto, estrutura fundamental para o adequado desempenho biomecânico do deslocamento humano (Mann, 1984; Van Boerum & Sangeorzan, 2003).

2.2.2 Quadro clínico e classificação da disfunção do tendão tibial posterior

Os sintomas provocados pela DTTP variam conforme a progressão da doença. Johnson e Strom (1989) foram os primeiros a propor um sistema de classificação baseado em estágios clínicos progressivos e relacionados à sintomatologia e às alterações radiográficas (Johnson & Strom, 1989). Posteriormente, Myerson *et al.* (1997) adicionaram o quarto estágio na classificação original (Myerson, 1997) e Bluman *et al.* (2007) subdividiram o sistema originalmente proposto (Bluman *et al.*, 2007).

No estágio I, os pacientes se apresentam com quadro de tenossinovite isolada do TTP, sem deformidade óssea, caracterizada por dor e edema de início insidioso, na região medial do tornozelo, localizada na topografia do tendão e relacionadas ao esforço físico. O estágio I é subdividido em: I-A - doença inflamatória, em que há apenas a inflamação do tendão ou lesão secundária à doença sistêmica; I-B – rotura parcial do TP com alinhamento normal do retropé; I-C – rotura parcial do TP, com leve desalinhamento do retropé (valgo menor ou igual a 5°).

No estágio II, ocorre a progressão da doença e as queixas são agravadas. Fadiga, limitação funcional e perda de força para realizar inversão e flexão plantar interferem no equilíbrio e limitam a deambulação em terrenos irregulares (Mann, 2001; Kohls-Gatzoulis *et al.*, 2004; Zgonis, 2014). Nesta fase, há lesão parcial ou até a rotura completa do tendão, juntamente com o estiramento dos tecidos moles mediais, principalmente das porções superomedial e inferomedial do ligamento calcaneonavicular plantar e do ligamento interósseo talocalcaneano (Deland *et al.*, 2005). O navicular desvia para dorsolateral e a articulação subtalar subluxa para lateral, o que resulta na diminuição da altura do arco longitudinal medial do pé, na abdução do antepé e no aumento do valgismo do retropé. As cápsulas articulares e os ligamentos plantares das articulações naviculocuneiforme e tarsometatarsais mediais também podem se tornar insuficientes e contribuir para o colapso do arco medial do mediopé e para a supinação compensatória de todo o antepé (Zgonis, 2014). Esse estágio, caracterizado pelo valgo flexível do retropé, é subdividido em três grupos: II-A, em que há deformidade em supinação do antepé, que pode ser flexível e passível de correção (II-A-1) ou rígida (II-A-2); II-B, diferenciado pela deformidade em abdução do antepé; II-C ao qual se soma a instabilidade plantar do primeiro raio.

Nos estágios clínicos tardios – estágios III e IV, ocorre o agravamento da insuficiência dos tecidos moles mediais e do valgismo do retropé, que se torna rígido e não redutível. O estágio III é subdividido conforme a ausência (III-A) ou presença (III-B) da deformidade em abdução do antepé. O posicionamento em valgo rígido do retropé leva o processo anterior do

calcâneo em direção à extremidade distal da fíbula e conseqüente impacto fibulocalcâneo. Assim, a sintomatologia álgica, inicialmente isolada na face medial do pé e tornozelo, torna-se mais acentuada em sua região lateral (Mosier *et al.*, 1999; Mann, 2001).

No estágio IV, a progressão do estresse em valgo acomete o tornozelo e leva à insuficiência do ligamento deltoide e à conseqüente inclinação em valgo da articulação tibiotalar. Tal estágio é, posteriormente, subdividido de acordo com presença de alterações articulares degenerativas, incipiente e flexível (IV-A), ou avançada e rígida (IV-B).

2.2.3 Fisiopatogenia da disfunção do tendão do músculo tibial posterior

Os fatores relacionados à patogênese da DTTP ainda estão em estudo na literatura. A primeira citação do pé plano adquirido do adulto foi feita por Rugh (1921), que observou três características associadas com a deformidade: encurtamento tendíneo do calcâneo, presença de osso navicular hipertrófico e de osso navicular acessório. Descreveu o retensionamento cirúrgico do TTP enfraquecido como possível forma de correção da deformidade (Rugh 1921).

Kidner (1929) propôs que a presença do navicular acessório afetaria negativamente o funcionamento do TTP, em virtude da alteração do braço de alavanca secundário ao deslocamento da inserção tendínea para medial e dorsal (Kidner, 1929).

Kulowski (1936) descreveu um caso sintomático de tenossinovite da bainha do TTP (Kulowski *et al.*, 1936). Key (1953) relatou os achados cirúrgicos de roturas parciais do TTP (Key 1953). Ghormley e Spear (1953) sugeriram que uma alteração anatômica do TTP seria responsável por sintomatologia dolorosa na região medial do tornozelo. Ghormley & Spear, (1953), Fowler *et al.* (1955) e Langenskiöld *et al.* (1967) relataram que tecido inflamatório peritendíneo teria papel importante na gênese da tenossinovite do TTP.

Kettelkamp & Alexander. (1969) relataram o diagnóstico tardio e a rotura espontânea do TTP em pacientes previamente sadios e as conseqüentes dificuldades técnicas para a correção cirúrgica (Kettelkamp & Alexander, 1969). Goldner *et al.* (1974) observaram a associação entre a deformidade progressiva do pé secundária à lesão degenerativa e traumática do TTP em nove pacientes. Descreveram a associação entre a lesão do ligamento calcaneonavicular plantar medial (ligamento mola) e a contratura do tríceps sural com a perda da sustentação do arco plantar e equinismo do retropé, respectivamente (Goldner *et al.*, 1974).

Giblin (1980), De Zwart & Davidson (1983) e Stein (1985) determinaram a relação das fraturas do maléolo medial do tornozelo com a gênese da lesão traumática direta do TTP.

Jahss *et al.* (1982) publicaram uma série de casos de rotura espontânea do TTP e as relacionaram com a estenose provocada pelo retináculo dos flexores do tornozelo, o que levaria à diminuição da perfusão tecidual e subsequente processo inflamatório e degenerativo crônico do tendão (Jahss, 1982).

Funk *et al.* (1986) descreveram quatro distintos padrões de lesão do TTP e propuseram uma classificação para auxiliar na conduta terapêutica. Observaram que uma parte dos pacientes não relatava a existência de episódios traumáticos prévios. Aventaram, então, a hipótese da associação de fatores intrínsecos e biomecânicos no desenvolvimento da tendinopatia (Funk DA, Cass JR, 1986).

Downey *et al.* (1988) observaram a presença de valores sistêmicos elevados do fator reumatoide em dois pacientes com diagnóstico de tenossinovite e rotura do TTP (Downey *et al.*, 1988). Myerson *et al.* (1989) demonstraram a associação da DTTP com a positividade de marcadores das doenças inflamatórias soronegativas, como o complexo antígeno leucocitário humano (HLA) (Myerson *et al.*, 1989).

Frey *et al.* (1990) descreveram uma zona de hipovascularização do TTP, localizada posterior e distal ao maléolo medial. Relataram que esta área de perfusão tecidual limítrofe e o seu aspecto anatômico característico, ao

realizar uma angulação aguda para anterior, seriam responsáveis pela maior fragilidade do tendão e predisposição à DTTP (Frey *et al.*, 1990).

Holmes e Mann (1992) verificaram a associação entre a presença da DTTP e comorbidades clínicas, como a hipertensão, obesidade, diabetes mellitus, e também com cirurgia ou trauma prévio na região medial do pé, bem como, o uso crônico de corticosteroide. Tais situações contribuem para o processo degenerativo tendíneo devido ao comprometimento da sua microcirculação e à diminuição da perfusão tecidual (Holmes & Mann, 1992).

Michelson *et al.* (1995) constataram que, em pacientes portadores de artrite reumatoide, o processo inflamatório sistêmico afeta não só a integridade do TTP, como também é responsável pelo comprometimento das articulações do retropé e de seus respectivos ligamentos. Essa degeneração articular resulta em maior instabilidade e, conseqüentemente, contribui para o agravamento da deformidade em plano valgo (Michelson *et al.*, 1995).

Mosier *et al.* (1999) observaram, nos tendões de pacientes portadores de DTTP, por meio da avaliação histopatológica, a presença de tendinose degenerativa em vez de um processo inflamatório. Relataram que há resposta reparativa inespecífica à lesão tecidual, caracterizada por degeneração mucinosa, hiper celularidade de fibroblastos, presença de metaplasia condroide e neovascularização. Estas alterações comprometem o tendão e predispõem a sua ruptura sob cargas fisiológicas. Não determinaram, no entanto, se essas mudanças precedem ou ocorrem posteriormente ao desenvolvimento da disfunção tendínea (Mosier *et al.*, 1999).

Bare e Haddad (2001) verificaram que a sobrecarga mecânica, devido a microtraumas de repetição, representa fator etiológico da DTTP. Os tendões submetidos ao estresse evoluem com modificações estruturais degenerativas associadas à resposta inflamatória crônica, e à alteração na composição da matriz extracelular e à falência funcional (Bare & Haddad, 2001).

Petersen *et al.* (2002) especificaram que a área hipovascular do TTP descrita por Frey *et al.* (Frey *et al.*, 1990) está localizada no segmento retromaleolar medial. Demonstraram a existência de maior concentração de tecido fibrocartilagenoso e de glicosaminoglicanos na região, e conseqüente

maior risco de desenvolver a tendinopatia devido ao baixo potencial de cicatrização (Petersen *et al.*, 2002).

Van Boerum e Sangeorzan (2003) relataram que a diminuição do arco longitudinal medial é causada pela ação conjunta de alterações, em especial, a DTTP, o encurtamento do tríceps sural, a obesidade e a frouxidão do ligamento calcaneonavicular plantar (ligamento mola) e da fáschia plantar (Van Boerum & Sangeorzan, 2003).

Sanhudo e Gomes (2014) observaram que a DTTP possui associação com a diferença entre o comprimento dos membros inferiores, e determinaram essa variação anatômica como fator de risco para sobrecarga mecânica do TTP e consequente disfunção (Sanhudo & Gomes, 2014).

2.3 O estrogênio e seus receptores celulares

Os estrogênios são hormônios sexuais que atuam diretamente no sistema reprodutor feminino e são responsáveis, principalmente, pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias, regulação dos ciclos menstruais durante a vida reprodutiva da mulher, preparação dos tecidos para ação da progesterona, manutenção da massa óssea, regulação da síntese de lipoproteínas, manutenção do trofismo urogenital, regulação da resposta à insulina, e manutenção do comportamento e da capacidade cognitiva (Alcazar *et al.*, 2010). Além disso, atingem diversos outros órgãos e sistemas, como o musculoesquelético (Riggs & Melton, 1992; Turner *et al.*, 1994; Weinstein & Manolagas, 2000; Bord *et al.*, 2001; Bryant *et al.*, 2008), cardiovascular, imunológico e sistema nervoso-central (Katzenellenbogen *et al.*, 1995).

A via metabólica dos estrogênios se inicia nas células esteroideogênicas, nas quais há síntese de hormônios sexuais precursores, a partir do colesterol. Este último é captado por receptores de lipoproteínas das membranas celulares, transportado por proteínas carreadoras do citoesqueleto do citosol para o interior das mitocôndrias, onde sofre a ação das enzimas do citocromo

P450 e conseqüente redução do número de átomos de carbono (Kendall & Eston, 2002).

Em seguida, ocorre a aromatização nos retículos endoplasmáticos, pela ação da enzima aromatase, principalmente nas células da granulosa dos ovários, durante a fase reprodutiva. A aromatase tem a capacidade de converter os androgênios em estrogênios, sejam eles produzidos em tecidos distantes ou adjacentes. As células dos tecidos adiposos e pele utilizam o androgênio, a androstenediona produzida no córtex da adrenal. Já as células da granulosa ovariana recebem das células vizinhas da teca interna (Nelson & Bulun, 2001).

A ação da aromatase ocorre, essencialmente, nas células ovarianas, adiposas e cutâneas; acontece, também, em outros tecidos extragonadais, tais como o neural, o hepático, o mamário, o testicular, o muscular e o ósseo. A partir dos androgênios, são formados três tipos de estrogênios: a estrona (E1), atinge maior concentração após a menopausa; o estradiol (E2), mais potente e em maior quantidade durante a vida reprodutiva; e o estriol (E3), formado após a hidroxilação da E1 (Gruber *et al.*, 2002).

Durante o ciclo menstrual regular, os estrogênios atingem o pico de concentração sérica durante a fase pré-ovulatória e, na fase pré-menstrual, o menor nível de concentração. Ao longo do processo de envelhecimento, com a falência dos folículos ovarianos após a menopausa, ocorre queda considerável na sua produção; passa a ocorrer nos tecidos extragonadais, principalmente no tecido adiposo, na pele, nos rins e no cérebro (Goji, 1993).

Na fase reprodutiva da mulher, o estrogênio é, majoritariamente, liberado na corrente sanguínea e atua em órgãos distantes da sua produção (função endócrina). Já na fase da pós-menopausa, passa a exercer a ação no próprio tecido produtor (função autócrina) ou nos tecidos adjacentes (função parácrina) (Cui *et al.*, 2013).

O estrogênio é uma pequena molécula lipofílica e entra na célula-alvo por difusão através da membrana plasmática (Welboren *et al.*, 2009). A ação molecular tem início no citoplasma celular, após a sua ligação aos receptores estrogênicos (Nilsson & Gustafsson, 2000). Os últimos são proteínas de

transcrição pertencentes à superfamília dos receptores nucleares hormonais ligantes dependente, da qual fazem parte também vários outros receptores hormonais, como o receptor androgênico e receptor de glicocorticoide (Welboren *et al.*, 2009).

Existem três tipos de RE descritos, sendo os mais prevalentes o receptor alfa e o receptor beta (Prossnitz *et al.*, 2007). A distribuição tecidual destes RE é variável. Ambos podem ser expressos no mesmo tecido ou em tecidos distintos em níveis variados (Nilsson *et al.*, 2001). A expressão dos RE1 prevalece em regiões como endométrio, células da mama, estroma ovariano, células de Leydig testiculares, epidídimo, osso, músculo esquelético, fígado, rins, tecido adiposo e cérebro. Já o RE2 predomina nas células endoteliais vasculares, rins, mucosa intestinal, parênquima pulmonar, cérebro, epitélio prostático, testículos, células da granulosa nos ovários, glândulas salivares e medula óssea (Kos *et al.*, 2001; Gruber *et al.*, 2002; Nilsson & Gustafsson, 2011).

O gene que codifica o RE1 está localizado no braço longo do cromossomo 6, no loci 6q25.1 e possui 8 éxons e 7 íntrons. Já o gene que codifica o RE2 está localizado no braço longo do cromossomo 14, no loci 14q22-24, e também é dividido em 8 éxons e 7 íntrons (Kuiper *et al.*, 1996; Gruber *et al.*, 2002).

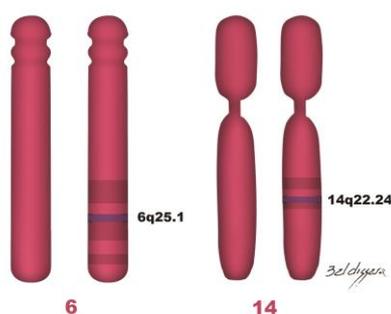


Figura 3 - Representação gráfica da localização do gene que codifica o RE1 no cromossomo 6 e o RE2 no cromossomo 14.

Esses receptores contêm uma arquitetura molecular semelhante e são constituídos por 6 regiões (ou domínios) independentes denominadas de A a F, que possuem funções específicas, mas interagem entre si (Nilsson *et al.*, 2001). Assemelham-se em cerca 18% de homologia na região A N-terminal; em 97% na região de ligação ao ADN; em 30% na região D; em 59% nos domínios de ligação ao hormônio e, em 18%, na região C-terminal (Kuiper *et al.*, 1996; Osborne *et al.*, 2000; Green *et al.*, 1986). O éxon 1 codifica as regiões A/B. Os éxons 2 e 3 codificam parte da região C. O éxon 4 codifica a porção restante da região C, todo o domínio D, e a porção amino-terminal da região E. Os éxons 5 a 8 codificam a região E, sendo a última, a região F, codificada pelo éxon 8 (Nott *et al.*, 2008).

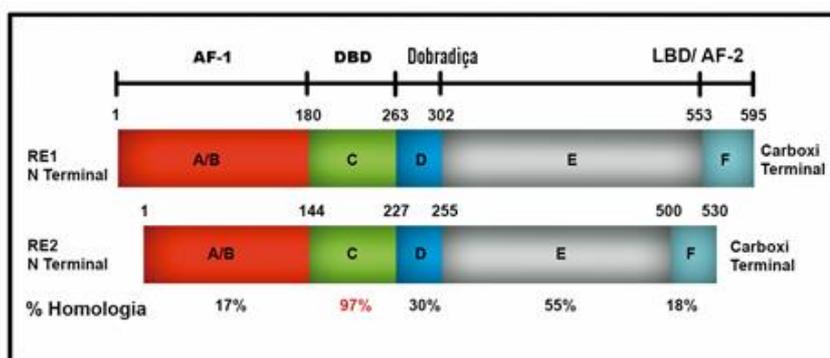


Figura 4 – Representação gráfica da estrutura dos domínios funcionais dos RE. DBD – Domínio de ligação ao ácido desoxirribonucleico (ADN); LBD – Domínio de ligação ao hormônio. AF – ativação da transcrição.

A região N-terminal (domínios A e B) tem papel na ativação do receptor, independente da ligação ao hormônio. Possui função de ativação da transcrição 1 (AF-1), a qual é envolvida nas interações com as proteínas correguladoras na ativação transcricional da expressão do gene-alvo (Nilsson & Gustafsson, 2011).

Na porção central, correspondente à região C, está o domínio de ligação com o ADN. É constituído por duas alças em "dedos de zinco", as quais contêm entre 60-70 aminoácidos e uma região carboxi-terminal. Na base do primeiro dedo de zinco, estão os aminoácidos importantes para a ligação ao

ADN. Já os aminoácidos do segundo dedo de zinco estão relacionados à dimerização do receptor (Nilsson & Gustafsson, 2011).

A região D está localizada entre o domínio C e E, e permite a rotação do domínio de ligação ao ADN. Contém sequências de aminoácidos que promovem a localização nuclear, as quais são alvo de modificações pós-translacionais que influenciam na atividade e degradação dos RE (Nilsson & Gustafsson, 2011).

A maior parte do domínio carboxi-terminal E/F é composta pela porção de ligação ao hormônio (E), que também participa da dimerização do RE e da interação com proteínas reguladoras, principalmente pela função de ativação da transcrição 2 (AF-2) (Ascenzi *et al.*, 2006; Nilsson & Gustafsson, 2011). O domínio F não apresenta capacidade de ligação com o estrogênio, e sua função está, basicamente, relacionada à dimerização do RE e à interação com proteínas reguladoras (Osborne & Schiff, 2005; Sonoda *et al.*, 2008; Nilsson & Gustafsson, 2011).

Os RE permanecem no citoplasma celular em estado inativo devido a ligações entre seu domínio específico de ligação ADN-receptor com proteínas estabilizadoras, como a "*heat shock protein*" (Hsp90) (Welboren *et al.*, 2009). Após a entrada do estrogênio no citoplasma e sua ligação ao RE, ocorre uma sequência de eventos que se inicia com a dissociação das Hsp90 como o RE, o que, por sua vez, provoca a dimerização do receptor com a formação de um homodímero ou heterodímero de RE estável. Então, o domínio ADN-receptor é exposto para que possa atuar na transcrição gênica específica, uma vez no interior do núcleo (Smith & Toft, 1993).

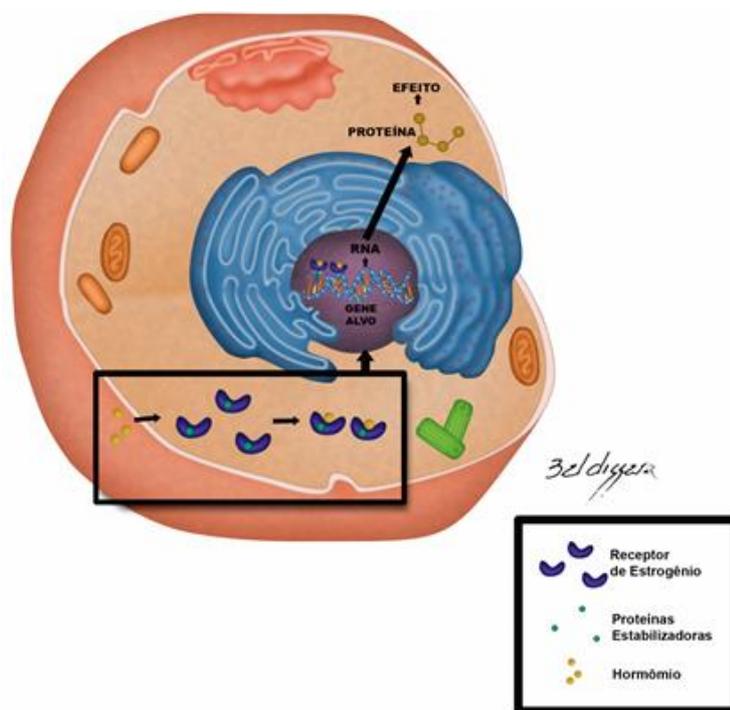


Figura 5 - Representação gráfica do Modelo da ação do estrogênio na via do Receptor de Estrogênio.

Os complexos RE-estrogênio formados, estimulados pela proteína do citosol chamada caveolina-1, difundem-se para o interior do núcleo e se ligam ao ADN diretamente (via clássica) ou indiretamente (via não clássica) (Welboren *et al.*, 2009). Pela via clássica, os RE dimerizados, por meio de seus domínios de ligação ao ADN, ligam-se a sequências específicas das regiões promotoras do ADN, chamadas de elementos de resposta ao estrogênio (ERE) (Schlegel *et al.*, 1999). Na via não clássica, o RE dimerizado se liga ao ADN por intermédio de outros fatores de transcrição, como a proteína Sp1, a proteína de ativação 1 (AP-1) ou fator nuclear kappa-b (NF-kB), e regulam a transcrição de maneira independente ao ERE (Welboren *et al.*, 2009).

Após esta fase, os complexos RE-ADN (via clássica) ou RE-fator de ativação (via não clássica), por meio dos sítios AF-2 (domínio E) ou AF-1 (domínio A/B), respectivamente, recrutam proteínas correguladoras ou cofatores para modular a transcrição gênica (Schlegel *et al.*, 1999). Os cofatores são grandes complexos proteicos que estimulam (coativadores) ou inibem (correpressores) a transcrição ao modificar a cromatina e possibilitar –

ou não – a ação do ácido ribonucleico (ARN) polimerase para a transcrição do ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) (Klinge, 2009). Essas são as formas pelas quais os RE interferem diretamente na tradução proteica e, conseqüentemente, na resposta fisiológica à ação hormonal.

Já foi descrita uma pluralidade de genes que respondem à ação do estrogênio (Carroll *et al.*, 2005; Stender *et al.*,; Kwon *et al.*, 2007). Este hormônio é capaz de ativar ou inibir diversos genes-alvo, incluindo aqueles envolvidos na regulação e na proliferação do ciclo celular, na apoptose e na regulação da transcrição (Saxon *et al.*, 2005; Welboren *et al.*, 2009).

Hipoteticamente, qualquer alteração neste complexo sistema molecular que resulte em modificação da resposta inicialmente esperada pela ação hormonal pode acarretar o desenvolvimento de patologias (Barone *et al.*, 2010; Farooq, 2015).

2.4 A influência do estrogênio no metabolismo tendíneo

Apesar das inúmeras evidências a respeito da atuação estrogênica nas diferentes estruturas que compõem o sistema musculoesquelético (Dempster & Lindsay, 1993; Carlson *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2001; Claassen *et al.*, 2005; Lane; Faibish *et al.*, 2006), a sua influência na homeostase do tecido tendíneo ainda não está definida.

Tiidus *et al.* (2001) demonstraram, em estudo experimental em ratos, o efeito protetor relacionado à suplementação de estrogênios, com menor incidência de inflamação e lesões musculares induzidas por exercício, em comparação aos controles (Tiidus, 2001). Contudo, estes achados não foram reproduzidos em estudo subsequente com seres humanos (Tiidus & Enns, 2009).

Savage e Clarkson (2002) avaliaram o grau de lesão muscular após exercícios de contração excêntrica de músculos flexores do cotovelo, em um grupo de mulheres na fase reprodutiva que faziam uso de contraceptivos orais combinados de estrogênio e progesterona, e compararam com o grupo-controle. Verificaram que o grupo que fez uso do hormônio exógeno

apresentou recuperação da força muscular mais tardiamente (Savage & Clarkson, 2002).

Holmes e Lin (2006) estudaram possíveis fatores etiológicos – entre eles, hipertensão, diabetes, obesidade e uso de hormônios – em pacientes com tendinopatia sintomática do tendão calcâneo. Encontraram um aumento significativo da prevalência da doença em 68% das mulheres que fizeram uso de terapia de reposição hormonal e 44% naquelas que utilizaram anticoncepcionais orais, em comparação aos controles. Os autores concluíram que havia a influência do estrogênio sobre o desenvolvimento da tendinopatia do tendão calcâneo (Holmes & Lin, 2006).

Cook *et al.* (2007) estudaram a frequência de alterações do tendão calcâneo em mulheres na pós-menopausa que faziam ou não uso de terapia de reposição hormonal (TRH). Evidenciaram maior prevalência de tendinopatia no grupo sem o uso da reposição, bem como, maior espessamento patológico do tendão. Os resultados sugerem que a TRH poderia reduzir a incidência de anormalidades estruturais e funcionais, porém não elucidam por qual mecanismo (Cook *et al.*, 2007).

Miller *et al.* (2007) compararam a síntese de colágeno tendíneo entre homens e mulheres, na fase reprodutiva, antes do esforço físico e após realizá-lo. Encontraram valores mais baixos na taxa da síntese de colágeno tendíneo nas mulheres do que nos homens, tanto em repouso quanto após 72h de exercício. Os resultados demonstram diferença entre gêneros, o que é compatível com a hipótese de que os hormônios sexuais, como o estrogênio, podem alterar o metabolismo da síntese de colágeno induzida por exercício físico (Miller *et al.*, 2007).

Magnusson *et al.* (2007) também estudaram a síntese de colágeno dos tendões humanos induzida pelo exercício; as propriedades mecânicas e morfologia desses tecidos, e em que medida ela é influenciada pelos níveis de estrogênios circulantes. Verificaram que, em virtude dos elevados níveis de estrogênio sérico, as mulheres apresentaram menor taxa de síntese de colágeno após o exercício, em comparação aos homens, bem como, menor resistência mecânica dos seus fascículos tendíneos. Quando atentaram, no

entanto, para as diferentes fases do ciclo menstrual, constataram que a síntese colágena era superior no período folicular precoce, quando a concentração sérica dos estrogênios é inferior (Magnusson *et al.*, 2007).

Hansen *et al.* (2008) estudaram a relação dos níveis séricos de estrogênio e a síntese de colágeno nos tendões. Compararam dois grupos de mulheres, sendo um usuário de contraceptivo oral e outro controle. Após as análises moleculares, observaram que o grupo que utilizava o hormônio apresentava menor concentração de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1), o qual atua como fator anabólico para os fibroblastos produzirem colágeno e, conseqüentemente, verificaram menor taxa de produção em relação ao controle (Hansen *et al.*, 2008).

Bryant *et al.* (2008) avaliaram os efeitos da variação hormonal estrogênica e a implicação disso na biomecânica do tendão calcâneo, ao comparar mulheres jovens que faziam uso de anticoncepcionais orais monofásicos com quem não utilizava hormônios. Verificaram que a flutuação hormonal fisiológica do ciclo menstrual não altera a tensão e a função do tendão. Encontraram, contudo, menor resistência tendínea nas mulheres que utilizavam contraceptivo oral monofásico (Bryant *et al.*, 2008).

Burgess *et al.* (2009) estudaram a influência dos diferentes níveis séricos hormonais durante o ciclo menstrual e as propriedades mecânicas do tendão. Não observaram diferença significativa em relação à rigidez, ao comprimento e ao diâmetro do tendão ao longo da oscilação das concentrações do estrogênio e da progesterona (Burgess *et al.*, 2009).

Hansen *et al.* (2009) avaliaram a influência do estradiol na síntese de colágeno de tendões, músculos e ossos. Compararam dois grupos de mulheres na fase reprodutiva, sendo um usuário de contraceptivo oral em altas doses e outro na fase do ciclo menstrual com menor concentração sérica hormonal. Após sobrecarga mecânica imposta, encontraram menores índices de síntese de colágeno nas três estruturas avaliadas no grupo com alta concentração hormonal (Hansen *et al.*, 2009).

Hansen *et al.* (2009) pesquisaram se os níveis séricos de estrogênio sintético influenciam na síntese de colágeno dos tendões em repouso e após

estímulos por exercícios em mulheres na pós-menopausa. Além disso, avaliaram se a terapia de reposição hormonal provoca alteração do diâmetro dos tendões patelares, bem como se adiciona risco de desenvolver tendinopatia. Encontraram aumento na síntese do colágeno do tendão e maior quantidade de fibrilas de médio tamanho no grupo que fazia reposição hormonal (Hansen *et al.*, 2009).

Circi *et al.* (2009), em estudo experimental em ratos, avaliaram a histologia e a biomecânica dos tendões dos animais ooforectomizados e de grupo-controle. Encontraram menor resistência às forças de tensão no grupo ooforectomizado, assim como, maior resposta inflamatória, associada à maior proliferação e densidade dos fibroblastos no grupo-controle. Verificaram, assim, que o estrogênio endógeno poderia influenciar positivamente a cicatrização do tendão calcâneo em ratos (Circi *et al.*, 2009).

Burgess *et al.* (2010) avaliaram a influência dos níveis hormonais, nas diferentes fases do ciclo menstrual, em mulheres no período reprodutivo que não utilizavam contraceptivos orais. Observaram que, independentemente da concentração sérica de estrogênio, não houve alteração das propriedades biomecânicas do tendão patelar (Burgess *et al.*, 2010).

Bridgeman *et al.* (2010) encontraram a expressão dos receptores estrogênicos alfa e beta nos tenócitos do TP de 8 indivíduos com DTTP e controles. No estudo, não evidenciaram diferença significativa entre os grupos, devido ao baixo número de elementos da sua amostra. (Bridgeman *et al.*, 2010).

Torricelli *et al.* (2013) estudaram a relação entre a proliferação e o metabolismo dos tenócitos e o seu envelhecimento em ratos jovens, ratos fêmeas adultas e ooforectomizadas. Nesse trabalho, também averiguaram a capacidade de cicatrização celular associada à deficiência estrogênica. Observaram que a animais ooforectomizados apresentavam menores taxas de proliferação celular e de produção de colágeno tipo I, agrecano e de elastina em comparação à população jovem. Além disso, constataram que a concentração de MMP-13 e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) era maior no grupo com carência hormonal com menor capacidade

de cicatrização e proliferação das células tendíneas e menores concentrações de colágeno I e de óxido nítrico (Torricelli *et al.*, 2013).

Hansen *et al.* (2013) estudaram a influência dos contraceptivos orais (CO) na mecânica do tendão em mulheres praticantes de atividade física na fase reprodutiva, quando comparadas a controles. Não encontraram diferenças entre os grupos em relação às propriedades mecânicas do tendão e características das fibras tendíneas (Hansen *et al.*, 2013).

Aydin *et al.* (2013) avaliaram os efeitos da carência estrogênica, a curto e longo prazo, nos tendões calcâneos de ratos. Observaram aumento significativo nos índices apoptóticos dos tenócitos dos animais submetidos à ooforectomia, quando comparados aos controles (Aydin *et al.*, 2013).

Huisman *et al.* (2014) analisaram a expressão dos genes codificantes de alguns componentes da matriz extracelular dos tendões de coelhos e sua relação com a carência estrogênica provocada por ooforectomia. Encontraram menor expressão gênica dos genes codificantes das agreganas, biglicanas decorinas e versicanas no grupo operado em comparação ao grupo-controle. Atribuíram essa menor expressão genética ao potencial efeito sistêmico do estrogênio (Huisman *et al.*, 2014).

Oliva *et al.* (2016) realizaram uma revisão sistemática acerca da influência de diversos hormônios e as tendinopatias. Constataram que, em estudos *in vivo* em humanos, os estrogênios afetam negativamente a função tendínea por diminuir a quantidade de tecido conectivo, estreitar o seu diâmetro e conferir menor resistência (Oliva *et al.*, 2016).

2.5 Os polimorfismos genéticos

2.5.1 Conceito

Os polimorfismos genéticos representam variações na sequência original de nucleotídeos que compõem o ácido desoxirribonucleico (ADN) e estão relacionados com a biodiversidade, variação genética, adaptação e evolução. Estão presentes em, aproximadamente, 1% da população

considerada geneticamente normal e podem ocorrer de forma multivariada (Alcazar *et al.*, 2010).

Entre os tipos de polimorfismos descritos, estão os de um único nucleotídeo, ou SNP (*single nucleotide polymorphism*), e os microssatélites, ou STR (*short tandem repeats*). Os SNP são os mais frequentes e correspondem a, aproximadamente, 90% dos polimorfismos. São caracterizados por ocorrência de mutação pontual na sequência de ADN, com substituição isolada de um único nucleotídeo. Estão distribuídos uniformemente por todo o genoma, característica que os torna excelentes marcadores para estudos e mapeamentos genéticos (Garcia-Closas & Chanock, 2008). Os microssatélites apresentam repetições características de sequências específicas de nucleotídeos, com unidade básica de mensuração de, aproximadamente, 2-6pb. O número de repetições em um *loci* gênico ocorre de maneira variável entre indivíduos e, assim, pode ser utilizado como marcador polimórfico no rastreamento de linhagens genéticas (Schuit *et al.*, 2004).

Embora a maioria dos polimorfismos seja funcionalmente neutra, isto é, ocorra nas regiões não codificantes dos genes e não conduzam a alterações de aminoácidos na proteína a ser traduzida, parte deles pode provocar modificações específicas em toda maquinaria da transcrição gênica, como alterações na estrutura e na estabilidade genômica do ADN (Zhang & Yu, 2007), no processo de *splicing* do ARN (Nott *et al.*, 2008) e na dobragem do ARNm (Shen *et al.*, 1999). Além disso, esses polimorfismos também podem estar em desequilíbrio de ligação com outras variações da sequência reguladora que interferem na expressão e na função dos genes-alvos (Stavrou *et al.*, 2006).

Assim, a presença dessas variações é capaz de interferir na expressão gênica e influenciar na síntese proteica e, conseqüentemente, provocar transformações no fenótipo, como, por exemplo, interferir na susceptibilidade e resistência à determinada doença, ou modificar a resposta a fármacos (Nott *et al.*, 2008).

2.5.2 Os polimorfismos dos genes dos receptores estrogênicos

2.5.2.1 SNP *PvuII* e *XbaI* do receptor de estrogênio alfa

A variação SNP *PvuII* (rs2234693) detecta a substituição de uma base nitrogenada citosina por timina (C/T) na posição -397 antes do éxon 2 (T-397int1C), enquanto o SNP *XbaI* (rs9340799) detecta a substituição de uma guanina por adenina (G/A) na posição -351 antes do éxon 2 (A-351int1G) (Hall & McDonnell, 1999).

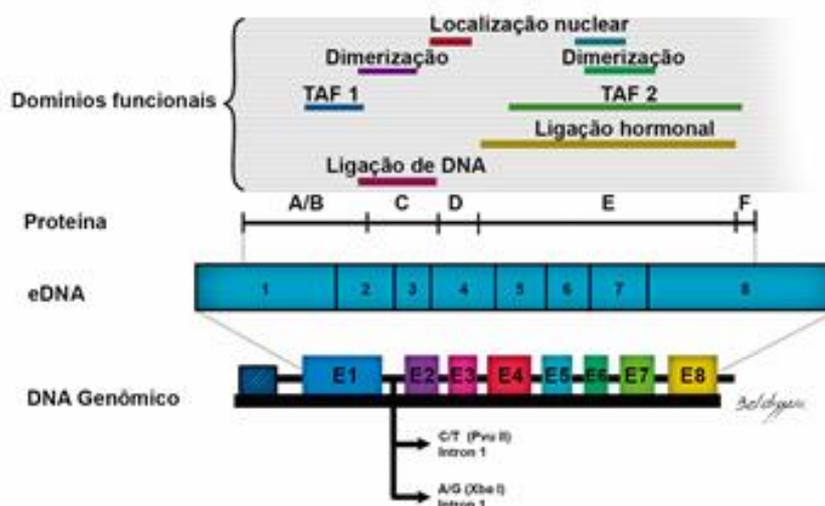


Figura 6 - Representação gráfica da estrutura do gene que codifica o RE1, dos seus domínios funcionais e a localização dos respectivos polimorfismos. Éxons codificantes são representados por quadrados.

2.5.2.2 SNP *AluI* do receptor de estrogênio beta

A variação SNP *AluI* (rs4986938) detecta a substituição de uma guanina por adenina (G/A) na posição -1730 do éxon 8 (Sundarrajan *et al.*, 2001).

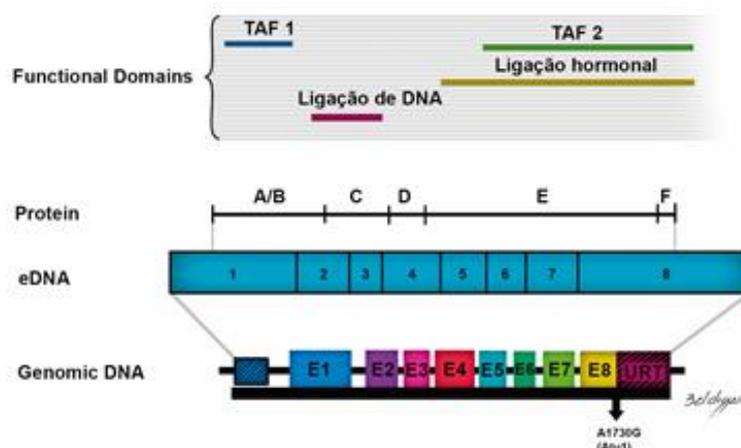


Figura 7 - Representação grafica da estrutura do gene que codifica o RE2, dos seus domínios funcionais e a localização dos respectivos polimorfismos. Éxons codificantes são representados por quadrados.

2.5.3 Os polimorfismos e as tendinopatias

Jozsa *et al.* (1989), em estudo epidemiológico com 832 indivíduos com diagnóstico de rotura tendínea, observaram maior frequência de tipagem sanguínea tipo O (57%) nesses pacientes, quando comparados à população em geral (31,1%). Relataram, ainda, maior frequência (68,7%) nos casos de roturas múltiplas ou novas roturas em tendões previamente lesionados (Jozsa *et al.*, 1989).

Mokone *et al.* (2005) demonstraram a associação entre o polimorfismo da região promotora do gene da tenascina-C, localizado no cromossomo 9q32-q34, e a tendinopatia do tendão calcâneo, por meio da pesquisa de microssatélites GTn. Observaram maior frequência dos alelos com 12 (18,9%) e 14 (9,2%) repetições em 114 indivíduos do grupo teste quando comparados a 127 controles (10,2% e 0,8%, respectivamente). Constataram, ainda, que os pacientes que possuíam estes alelos (GT₁₂ e GT₁₄) apresentavam chance seis vezes maior para desenvolver a tendinopatia (Mokone *et al.*, 2005).

Mokone *et al.* (2006) verificaram, em caucasianos, a associação entre o diagnóstico de tendinopatia do calcâneo e a presença de polimorfismos no gene que codifica a cadeia alfa 1 do colágeno V (COL5A1), mais

especificamente, os SNP *Bst*UI (rs12722) e *Dpn*II (rs13946). Esse trabalho, que incluiu 111 casos e 129 controles, observaram maior frequência do alelo A2 do COL5A1 e 2,6 vezes menor chance de desenvolvimento da patologia nos pacientes controles (Mokone *et al.*, 2006).

September *et al.* (2008) investigaram a associação de tendinopatias e roturas do tendão calcâneo com a presença de polimorfismos dos genes codificadores do colágeno, como o SNP *Bsr*I (rs240736) e *Al*uI (rs970547) – genes que codificam os colágenos XII (COL12A1) – e *Bst*YI (rs4870723) e *Sspl* (rs1563392) – codificadores do colágeno XIV (COL14A1). Participaram do estudo 93 caucasianos portadores de tendinopatia crônica, 44 com diagnóstico prévio de rotura e 131 controles. Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos (September *et al.*, 2008).

September *et al.* (2009) estudaram a associação entre a tendinopatia crônica e as variações genótípicas do COL5A1 RFLP *Bst*UI (rs12722), *Dpn*II (rs13946), rs10858286, rs3196378, rs11103544, rs4504708 e rs3128575 em dois grupos de diferentes origens; sul-africana (93 casos e 132 controles) e australiana (85 casos e 210 controles). Encontraram associação significativa entre a tendinopatia e os polimorfismos rs12722 e rs3196378 nos indivíduos de origem australiana. Em ambas as populações, portadores do genótipo CC para COL5A1 RFLP *Bst*UI apresentaram menor risco de desenvolver a tendinopatia quando comparados aos outros genótipos estudados. O genótipo TC das variações rs12722 e rs3196378 apresentaram maior frequência apenas nos indivíduos de origem sul-africana, com diagnóstico de tendinopatia, o que poderia conferir maior risco de desenvolver a doença (September *et al.*, 2009).

Raleigh *et al.* (2009) pesquisaram a associação entre as variações genótípicas das posições rs679620, rs591058 e rs650108 do gene que codifica a metaloproteinase da matriz extracelular 3 (MMP3) e o diagnóstico de tendinopatia e/ou ruptura do tendão calcâneo em 114 casos e 98 controles. Encontraram associação entre tendinopatia e presença dos genótipos GG da variação rs679620, CC da variação rs591058 e AA da variação rs650108. Verificaram, ainda, menor frequência do haplótipo ATG (das variações

rs679620, rs591058 e rs650108) nesse mesmo grupo. Demonstraram, ainda, que os alelos G da rs679620 e T da rs12722 do gene COL5A1 estariam associados com maior risco de desenvolver tendinopatia. Não encontraram associação entre os polimorfismos estudados com o diagnóstico de ruptura tendínea (Raleigh *et al.*, 2009).

Posthumus *et al.* (2009) não encontraram associação dos mesmos diagnósticos com a variação polimórfica SNP rs 1800012 do sítio de ligação Sp-1 do gene que codifica a cadeia alfa-1 do colágeno I (COL1A1) quando estudaram 126 casos e 126 controles de origem sul-africana (Posthumus *et al.*, 2009)

September *et al.* (2011), em um estudo caso-controle em duas populações, australiana e sul-africana, avaliaram associação entre a presença de polimorfismos nos genes codificadores das interleucinas (IL) – IL-1 β , IL-1RN e IL-6 – e a tendinopatia do tendão calcâneo. Pesquisaram a existência dos polimorfismos SNP rs1143627 e rs16944, referentes à IL-1 β , o microssatélite rs2234663, da IL-1RN, e o SNP rs1800795, relacionado à IL-6, em 175 casos e 369 controles. Compararam, também, a frequência destes polimorfismos com os alelos SNP COL5A1 RFLP *Bst*UI (rs12722). Na análise isolada dos genes, não encontraram associação entre nenhum polimorfismo e a tendinopatia. Após a combinação dos cinco alelos e a estratificação dos grupos por gênero e nacionalidade dos participantes, entretanto, os resultados mostraram um forte e significativo aumento de risco para desenvolver a tendinopatia na presença dos polimorfismos (September *et al.*, 2011).

Godoy-Santos *et al.* (2011) descreveram a associação entre o polimorfismo SNP RFLP -799 C-T (rs11225395) – gene que codifica a metaloproteinase 8 da matriz extracelular (MMP8) – e a tendinopatia do tibial posterior. Observaram maior frequência dos alelos C (71%) e T (64,3%) em indivíduos com a tendinopatia, quando comparados aos controles (29% e 35,7%, respectivamente). Tais resultados sugerem a atuação do polimorfismo estudado como fator de risco para a TTP (Godoy-Santos *et al.*, 2011).

Saunders *et al.* (2013) investigaram a frequência das variações genéticas SNP dos genes codificantes da tenascina-C nas posições rs13321,

rs2104772 e rs1330363, e do colágeno XXVII (COL27A1), nas posições rs4143245, rs1249744, rs753085, rs946053 em 173 indivíduos de origem sul-africana e australiana portadores da tendinopatia do calcâneo e 339 controles. Não observaram diferenças significativas nos genótipos ou frequência dos alelos nas posições rs4143245, rs1249744, rs753085, rs946053, e rs13321. Verificaram, no entanto, que indivíduos do grupo de estudo apresentavam menor frequência dos alelos T (posição rs2104772) e maior frequência dos alelos G (posição rs1330363). O haplótipo GCA da tenascina-C (rs946053/rs13321/rs2104772) se mostrou mais frequente nos casos (27%) do que nos controles (18%). Descreveram também que a presença do alelo T do polimorfismo (G>T) rs946053 estaria relacionada com a eliminação do sítio de ligação do fator de transcrição c-Myc, o que provocaria expressão inapropriada do COL27A1 (Saunders *et al.*, 2013).

Abrahams *et al.* (2013) estudaram em caucasianos a relação entre tendinopatia do calcâneo e presença de polimorfismos SNP específicos de região funcional do gene codificante da cadeia alfa-1 do colágeno V (COL5A1) – rs71746744, rs16399 e rs1134170 – assim como do gene MIR-608 (rs4919510), o qual contém alguns elementos funcionais da transcrição, como os sítios de ligação Has-MIR-608. Encontraram maior frequência dos polimorfismos estudados em 160 indivíduos com diagnóstico de tendinopatia, quando comparados a 342 controles. Constataram, ainda, que os portadores dos polimorfismos do gene COL5A1 apresentavam alterações estruturais dos ARNm do colágeno V –potencialmente interferindo na sua tradução. Concluíram, ainda, que os indivíduos do grupo-caso apresentam duas vezes maior risco de desenvolver a doença (Abrahams *et al.*, 2013).

Godoy-Santos *et al.* (2013), em estudo caso-controle envolvendo 50 mulheres com diagnóstico de TTP e 100 controles relataram quatro vezes maior risco de desenvolvimento da tendinopatia em indivíduos portadores do polimorfismo –1607 na região promotora do gene da metaloproteinase 1 da matriz extracelular (MMP1). Relataram diferença significativa na frequência dos alelos – 1G (22% vs 75%) e 2G (78% vs 25%) – e genótipos estudados –

1G/1G (16% vs 62%), 2G/2G (72% vs 12%) e 1G/2G (12% vs 26%) – em testes e controles, respectivamente (Godoy-Santos *et al.*, 2013).

El Khoury *et al.* (2013) verificaram associação entre tendinopatia do calcâneo e o polimorfismo do gene TIMP2 (rs4789932), que codifica importante inibidor das metaloproteinases. Observaram maior e menor frequências, respectivamente, dos genótipos CT (56,7% vs 42,4%) e CC (26,6% vs 36%) em 115 casos quando comparados a 98 controles. Não foi encontrada associação da tendinopatia com outras variações polimórficas SNP estudadas: genes ADAMTS2 (rs1054480), ADAMTS5 (rs 226794), ADAMTS14 (rs4747096), ADAMT12 (rs3740199), codificadores das N-proteptidases dos procolágenos I, II e III (El Khoury *et al.*, 2013).

Hay *et al.* (2013) não encontraram diferença na distribuição dos diferentes alelos e genótipos dos polimorfismos SNP dos genes que codificam o colágeno XI – rs3753841 (COL11A1), rs1676486 (COL11A1) e rs1799907 (COL11A2) – quando comparados isoladamente entre 184 indivíduos com tendinopatia e 338 controles. Na avaliação combinada das três variações, porém, observaram maior frequência do pseudo-haplótipo TCT (25,9% vs 17,1%) nos casos em comparação aos controles (Hay *et al.*, 2013).

Pruna *et al.* (2013), em estudo retrospectivo com 73 futebolistas profissionais – com histórico de lesões não traumáticas musculares, ligamentares e tendíneas – não encontraram associação entre diferentes polimorfismos SNP estudados (ELN, TTN, SOX15, IGF-2, quimiocina, CCL2, COL1A1, COL5A1 e TNC) e a ocorrência de tendinopatias (Pruna *et al.*, 2013).

Motta *et al.* (2014), investigaram, em 203 indivíduos com tendinopatia do manguito rotador e 207 controles, a presença de 23 polimorfismos SNP em seis genes relacionados ao processo de degeneração e reparação tendínea, sendo eles o DEFB1 (rs11362 e rs1800972), DENND2C (rs10858049 e rs10861369), ESRRB (rs4903399, rs1077430, rs2860216, rs10132091, rs1676303, rs745011, rs4903419 e rs6574293), FGF3 (rs7932320, rs1893047, rs12574452, rs4631909 e rs4980700), FGF10 (rs1448037, rs900379, rs1011814, rs593307 e rs11750845) e FGFR1 (rs13317). Observaram que os polimorfismos SNP rs1800972 do gene DEFB1, rs13317

do gene FGFR1, rs11750845 e rs1011814, ambos do gene FGF10, além dos haplótipos do gene FGF3 e do ESRRB, nos cromossomos 11 e 14, respectivamente, apresentaram significativa associação com a tendinopatia (Motta *et al.*, 2014).

Erduran *et al.* (2014) não encontraram diferença significativa na frequência do polimorfismo SNP (rs1800012) do gene do sítio de ligação Sp1 do colágeno tipo I (COL1A1), quando compararam 103 indivíduos com epicondilite lateral do cotovelo e 103 controles (Erduran *et al.*, 2014).

Foster *et al.* (2014) avaliaram 84 caucasianos (18-39 anos), praticantes de atividades esportivas recreacionais, assintomáticas, e não encontraram relação entre a presença do polimorfismo SNP rs 12722 – gene que codifica a cadeia alfa-1 do colágeno V – e alterações do módulo de elasticidade e volume do tendão patelar nestes indivíduos (Foster *et al.*, 2014).

Baroneza *et al.* (2014) relataram maior frequência de diferentes polimorfismos do gene codificador da metaloproteinase da matriz 1 (MMP1) – 1607 (rs1799750) e – 519 (rs1144393) – em 50 pacientes do sexo feminino com diagnóstico de TTP graus 2 e 3, quando comparadas a 100 controles. Encontraram diferença significativa entre os grupos, sendo que tanto o alelo G (rs1144393) quanto os haplótipos G-2G e A-2G, apresentaram risco aumentado para desenvolvimento da tendinopatia (Baroneza *et al.*, 2014).

Godoy-Santos *et al.* (2014) encontraram maior frequência do alelo T do polimorfismo SNP RFLP -799 C-T (rs11225395) – gene que codifica a MMP8 – em 50 pacientes do sexo feminino com diagnóstico de TTP em comparação a 100 controles. Observaram também maior presença do alelo C (72%) nos pacientes do grupo-controle (Godoy-Santos *et al.*, 2014).

Salles *et al.* (2015) avaliaram a presença de polimorfismos SNP de múltiplos genes codificadores de proteínas relacionadas com síntese colágena e reparo tecidual tendíneo, em atletas profissionais de voleibol – BMP4 (rs2761884, rs 17563, rs2855529, rs20710470 e rs762642), FGF3 (rs7932320, rs1893047, rs12574452, rs4631909 e rs4980700), FGF10 (rs1448037, rs900379, rs1011814 e rs593307) e FGFR1 (rs13317).

Compararam os achados entre 52 esportistas com diagnóstico de tendinopatias diversas e 86 controles.

Evidenciaram maior presença do haplótipo TTGGA e do alelo T (polimorfismo rs2761884 do gene BMP4), haplótipo TGGTA (gene do FGF3) e também do polimorfismo rs900379 (gene do FGF10) (Salles *et al.*, 2015).

Teerlink *et al.* (2015), em estudo caso-controle, descreveram diferença significativa na presença de polimorfismos SNP do RE2 (rs17583842 e rs7157192) em 175 indivíduos diagnosticados com rotura do manguito rotador (RMR), comparados a 2.595 controles advindos de um banco de dados genéticos. Encontraram associação apenas em um dos SNP do gene codificante do ESRRB (rs17583842). Não constataram diferenças entre os grupos na avaliação de polimorfismos dos genes que codificam DEFB1, DENND2C, FGF3, FGF10 e FGFR (Teerlink *et al.*, 2015).

Tashjian *et al.* (2016), em estudo caso-controle, avaliaram a presença de associação entre a RMR e uma ampla variedade de SNP, ao todo 257.588 de todo genoma, em 311 indivíduos, diagnosticados com a doença comparados a 2641 controles advindos de um banco de dados genéticos. Encontraram que dois SNP, *SAP30BP* e *SASH1*, ambos de genes relacionados com o processo celular de apoptose, foram significativamente associados com a RMR (Tashjian *et al.*, 2016).

Kluger *et al.* (2016), em estudo caso-controle, estudaram dois grupos combinados, com 155 pacientes portadores de RMR e 76 controles assintomáticos. Avaliaram 79 SNP localizados em 8 genes: TNC, Col5A1, TIMP-1, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13. Chegaram à conclusão de que 6 SNP no gene da tenascina-C estão associados com RMR (Kluger *et al.*, 2016).

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Estudo Caso-Controlado realizado no Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT), no Ambulatório da Menopausa e no Laboratório de Investigação Médica 58 (LIM-58) – Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular, ambos vinculados ao Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Pacientes que preencheram critérios de seleção foram divididos em dois grupos, casos e controles, que diferiram quanto à presença ou ausência da DTTP. Não houve mudanças no desenho do estudo durante o seu desenvolvimento.

3.2 Aprovação da Comissão de Ética e termo de consentimento

O estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 971 (Anexo A) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número 10166-2013 (Anexo B).

Esse projeto recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Processo nº 2015/19635-1 (Anexo C).

Para todos os pacientes selecionados, foi explicado o motivo e as condições da pesquisa, e oferecida a opção voluntária de participação. As concordantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), que explicava detalhadamente, em termos compreensíveis, os objetivos do

estudo e que lhes assegurava a opção de abandonar a participação, sem prejuízo da assistência médica (Anexo D).

3.3 Critérios de seleção

As participantes foram selecionadas nos ambulatórios do Grupo de Pé e Tornozelo do Instituto de Ortopedia e Traumatologia e da Disciplina de Ginecologia do HC-FMUSP.

3.3.1 Critérios de inclusão

As pacientes incluídas no estudo apresentavam todos os seguintes critérios:

- a) gênero feminino;
- b) faixa etária superior a 40 anos;
- c) diagnóstico clínico e laboratorial de menopausa:
 - doze meses em amenorreia;
 - hormônio folículo estimulante (FSH) > 45mU/mL e estradiol < 20pg/mL);
- d) diagnóstico clínico de DTTP ou ausência dele (para o grupo-controle);
- e) achados no exame de RM compatíveis com o diagnóstico de DTTP ou ausência completa deles (para o grupo-controle).

Os critérios clínicos utilizados para o diagnóstico da DTTP foram: presença de dor na região medial do tornozelo e retropé, na topografia do trajeto do TTP, associado ou não às alterações que conferem maior gravidade, como limitação e ausência de varização dinâmica do retropé durante teste da elevação na ponta dos pés, diminuição do arco longitudinal medial plantar, valgismo do retropé e abdução do antepé.

Consideram-se achados compatíveis com o diagnóstico de DTTP, no exame de RM, a presença de uma ou mais das seguintes alterações:

- a) tendinopatia insercional do TTP;
- b) tenossinovite do TTP;
- c) rotura intrassubstancial do TTP.

Os pacientes alocados no grupo-controle não apresentavam qualquer uma das alterações clínicas ou de imagem previamente descritas.

3.3.2 Critérios de não inclusão

As pacientes que apresentassem uma ou mais das seguintes comorbidades não foram incluídas no estudo:

- a) presença de doenças reumatológicas ou imunológicas;
- b) presença ou histórico de infecção do pé e tornozelo;
- c) histórico de cirurgias ou lesão traumática no pé e tornozelo;
- d) diabetes mellitus.

3.3.3 Critérios de exclusão

Foram retiradas do estudo as pacientes cujas amostras não tivessem material suficiente para a análise molecular.

3.4 Formação dos grupos de estudo

As pacientes incluídas no estudo foram divididas em dois grupos:

Grupo-caso: 101 mulheres com diagnóstico clínico e laboratorial de menopausa e sintomatologia de tendinopatia do tibial posterior, confirmadas tanto por avaliação clínica quanto por exame de ressonância magnética (RM).

Grupo-controle: 101 mulheres com diagnóstico clínico e laboratorial de menopausa, assintomáticas e com ausência de tendinopatia do tibial posterior confirmadas tanto por avaliação clínica quanto por exame de RM.

3.5 Coleta de informações, exame clínico e de imagem, obtenção das amostras e extração do ADN e avaliação dos desfechos.

As pacientes participaram da pesquisa após atendimento realizado pelo médico assistente. Inicialmente, foram coletados dados de identificação (nome e idade) e antropométricos (peso e altura); questionou-se a existência de deformidades progressas nos pés e tempo de sintomas relacionados com a DTTP e antecedentes médicos pessoais (tempo de menopausa e comorbidades clínicas).

Em seguida, foi realizada a avaliação clínica ortopédica direcionada por meio da avaliação estática do alinhamento do pé e dinâmico da mobilidade das articulações do tarso, assim como pontos de palpação dolorosa e médio-tarso. Após exame clínico, procedeu-se à avaliação das imagens do exame de RM.



Figura 8 - Avaliação clínica do alinhamento do pé (A e B) e das imagens axial (C, D), sagital (E) e coronal (F) da RM evidenciam rotura da substância e tenossinovite do TTP.

Na sequência; foram coletas amostras de saliva das pacientes por meio de um bochecho com 3 ml de solução autoclavada de glicose a 3% (concentração isomolar com a saliva), durante 2 minutos (Trevilatto & Line 2000). A esta solução foi adicionada 2ml de álcool a 70% e 1 ml de solução

TNE (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl e 2 mM *EDTA*) acondicionados em tubos estéreis tipo Falcon 15ml numerados sequencialmente. Todas as amostras foram entregues no Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular da Disciplina de Ginecologia (LIM 58) do HC-FMUSP para prosseguir com as análises moleculares.

As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm, para coleta da fase celular. Na suspensão das células, foi acrescido 1,3 ml de solução de extração (Tris-Cl a 10 mM, (pH 7,8), *EDTA* a 5 mM e SDS a 0,5%), e as amostras foram congeladas a -20°C até o momento de extração do ADN.

3.5.1 Extração do ADN

A extração do ADN foi realizada conforme protocolo de Aidar e Line (Aidar & Line 2007). As amostras foram incubadas *overnight* (ON) com 20 mg/ml de proteinase K (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA*) a 56 °C. Após esse processo, foram adicionados 500 ul de solução de acetato de amônio 10mM com *EDTA* 1mM e vortexados por 5 segundos. Centrifugado a 12000 giros por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e, a ele, foram adicionados 540 ul de isopropanol para cada 900 ul da solução contendo ADN. Após nova centrifugação, foi realizada a lavagem do precipitado com etanol a 70% e, posteriormente, secado por 15 minutos à temperatura ambiente. O ADN foi submetido à suspensão em 100 ul de tampão *TE* (Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8), *EDTA* a 1 mM) à temperatura ambiente por três horas.

Após a extração, todas as amostras foram submetidas à purificação utilizando o protocolo *QiAamp®DNA Mini and Blood Mini Handbook* – Qiagen (Anexo E) para retirada de impurezas que poderiam inibir as etapas seguintes, como as reações de polimerização e sequenciamento.

3.5.2 Amplificação dos fragmentos e Polimerase chain reaction – Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

A técnica de PCR foi utilizada para amplificação dos fragmentos das regiões específicas dos genes codificantes do RE1 e RE2. Foram utilizados de 20 – 100ng do ADN genômico em um volume final de 50 µl de reação contendo: 5pmol/µl de cada oligonucleotídeo iniciador (ver Tabela 1 para referência), 10 µl de mix Promega (50U/ml de *Taq DNA polymerase* com buffer de reação – pH 8.5, 400µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 3mM de MgCL₂, Promega Cooperation, Madison, WI, USA) e 12 µl H₂O de “*nuclease-free*” (Sigma).

A reação foi realizada em termociclador (Veriti, *Applied Biosystems*) por 40 ciclos, seguindo as seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. A análise dos fragmentos obtidos foi feita em gel de agarose 1% impregnado com brometo de etídio para confirmar o tamanho e a pureza dos produtos de PCR (Figura 9 e 10).

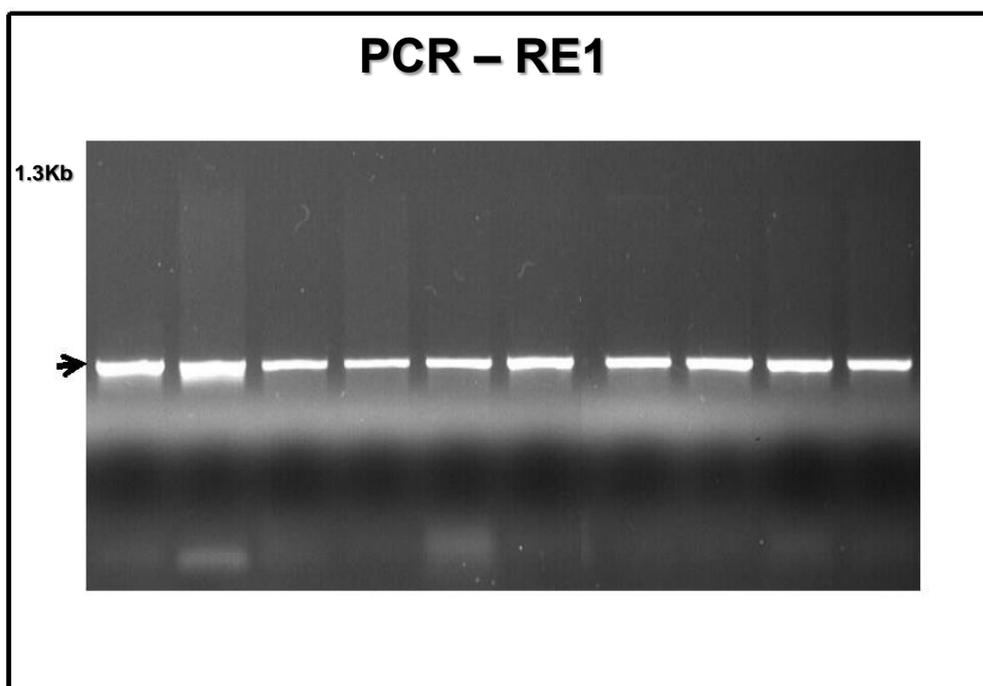


Figura 9 - Gel de agarose 1% impregnado com brometo de etídio apresentando o perfil de migração dos produtos de PCR obtidos para RE1. A seta indica a migração dos fragmentos em ~1.3 Kb.

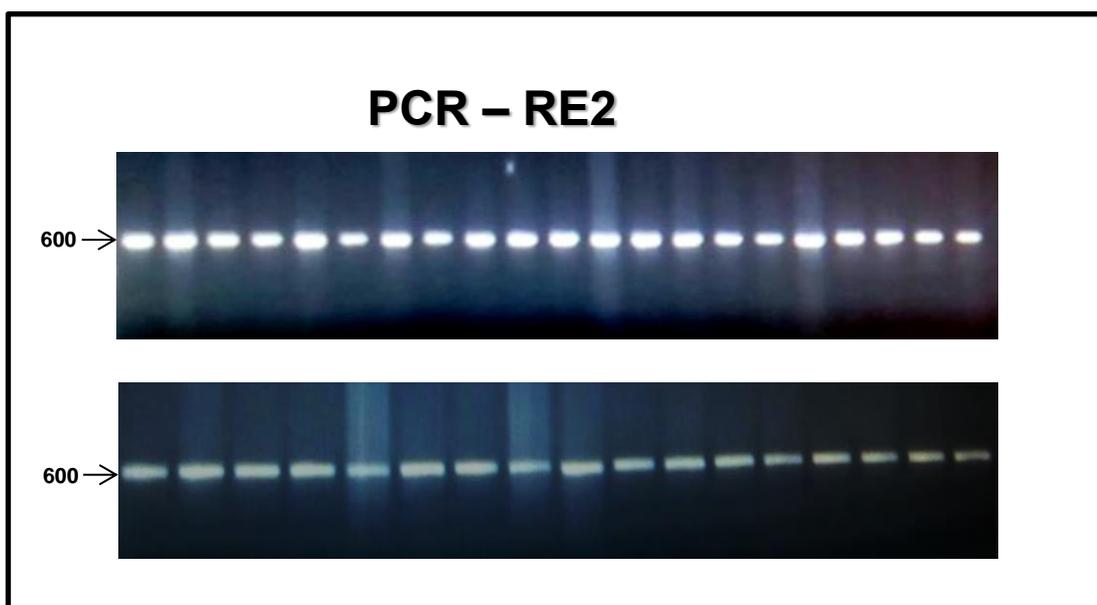


Figura 10 - Gel de agarose (2%) representativo do perfil de amplificação dos fragmentos de PCR para o polimorfismo *AluI* do RE2. As setas indicam a migração de cada um dos fragmentos em seus tamanhos esperados (~600 pb).

Para análise dos polimorfismos presentes nos genes dos receptores estrogênicos, os produtos de PCR foram incubados com as enzimas: *Pvu* II, *Xba* I e *AluI* (Thermoscientific) conforme as instruções do fabricante (Anexo F). Rapidamente, 1 ug do produto de PCR foi incubado a 37 °C por toda uma noite com 1U (unidade) de cada enzima utilizada em tampão específico para cada uma. Posteriormente, os produtos das restrições enzimáticas foram avaliados em géis de agarose a 2% impregnados com brometo de etídeo (Figuras 11 e 12).

Tabela 1 - Informações sobre os primers a serem utilizados na técnica de PCR e de RFLP.

Gene	Oligonucleotídeos (5' - 3')	Enzima
<i>RE1</i>	S: CGTCTACTCCTATGTCTGGT AS: CGTGTA GACTGAAGGGCAT	<i>PvuII</i>
<i>RE1</i>	S: GTGTGTGGTGGGACACAGAG AS:AGGCCATTGAGTGTGGAAAC	<i>XbaI</i>
<i>RE2</i>	S: GTGTGTGGTGGGACACAGAG AS:AGGCCATTGAGTGTGGAAAC	<i>AluI</i>

S: sequência senso. AS: sequência antissenso.

PCR – RFLP RE1

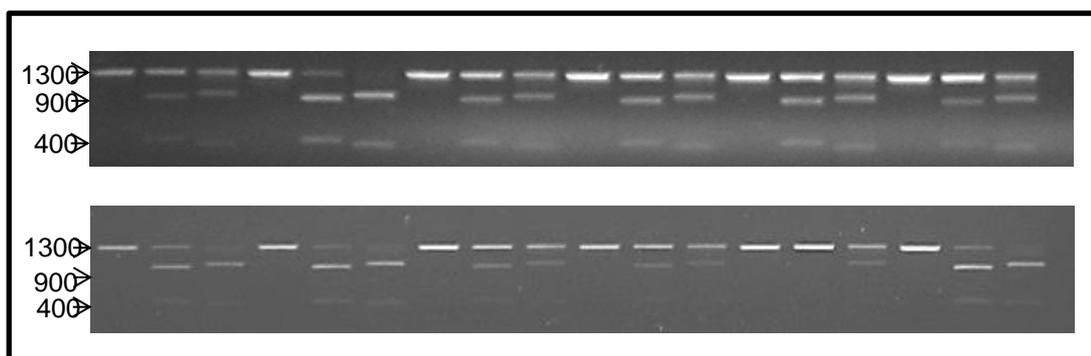


Figura 11 - Géis de agarose (2%) representativos do padrão de polimorfismo obtido na restrição com *XbaI* e *PvuII* de amostras amplificadas para o RE1. Amostras com uma banda única de ~1300 pb indicam perfil selvagem para ambas as enzimas. As amostras com três bandas (~1300, ~900 e ~400pb) e com duas bandas (~900 e ~400pb) indicam o perfil heterozigoto e homozigoto para a mutação, respectivamente. As setas indicam a migração de cada um dos fragmentos esperados.

PCR – RFLP RE2

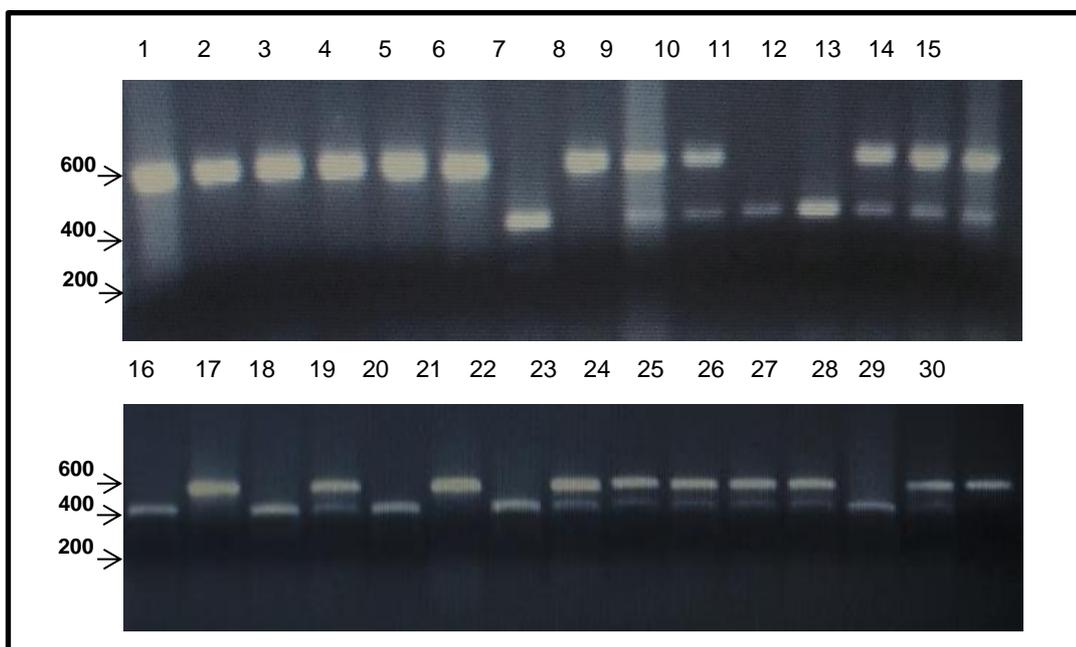


Figura 12 - Gel de agarose (2%) representativo do padrão de polimorfismo obtido na restrição com *AluI* de amostras amplificadas para o RE2. Amostras com banda única em ~600 pb indicam perfil selvagem; presença de duas bandas em 600 e 400 pb indicam heterozigose (e.g., amostras 23 - 27) e o homozigoto para a mutação apresenta duas bandas de 400 e 200 pb (e.g., amostras 7, 11 e 12), respectivamente. As setas indicam a migração de cada um dos fragmentos em seus tamanhos esperados.

3.5.3 Avaliação dos desfechos

O desfecho primário do estudo foi a comparação da frequência dos SNP *PvuII* e *XbaI* do gene codificante do RE1 e o SNP *AluI* do gene codificante do RE2 entre os grupos caso e controle.

Os desfechos secundários foram:

- avaliação da influência das variáveis demográficas (idade, IMC) no desenvolvimento da DTTP;
- avaliação da frequência de pé plano prévio e a comparação entre os grupos caso e controle;
- comparação da frequência dos haplótipos – combinação de alelos de loci adjacentes de um mesmo cromossomo – dos polimorfismos *PvuII* e *XbaI* do gene codificante dos RE1.

3.6 Cálculo da amostra

A estimativa do cálculo de tamanho da amostra foi realizada para estudo caso-controle (proporção 1:1) para um poder do teste de 75%, nível de significância de 5%; estimativa de proporção exposta de polimorfismo xx entre os controles de 18% e proporção exposta de polimorfismo “xx” entre os controles de 36% (Schelesselman, 1982). As estimativas foram obtidas via amostra-piloto. Com base nesses critérios, chegou-se ao número de 84 participantes em cada grupo. Considerou-se uma taxa esperada de 20% de perda e, inicialmente, foram incluídas um total de 202 pacientes.

3.7 Cegamento

O cegamento ocorreu por parte dos avaliadores das amostras, durante a fase de análise molecular. As amostras eram identificadas por números

sequenciais e os técnicos do laboratório não obtiveram informações acerca de qual grupo pertenciam os pacientes.

3.8 Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW)

Com base no princípio de *Hardy-Weinberg*, foi verificado se as frequências genóticas dos polimorfismos *PvuII*, *XbaI* e *AluI* estavam em equilíbrio por meio do seguinte modelo matemático:

$$(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$$

Nesta equação, "p" representa a frequência do alelo dominante, enquanto "q", a frequência do alelo recessivo. Portanto, p^2 e q^2 são as frequências esperadas para homocigoto dominante e homocigoto recessivo, respectivamente, enquanto $2pq$ é a frequência esperada para heterocigotos na população. Diz-se que os polimorfismos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* quando o valor-p é maior do que 5% (Namipashaki *et al.*, 2015).

3.9 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram expressas pela média, pela mediana, pelo desvio padrão, pelo mínimo e máximo, enquanto as variáveis qualitativas foram expressas com a frequência absoluta e relativa da amostra em estudo.

Para a comparação das variáveis quantitativas entre os grupos de estudo, foi aplicado o teste t de student para amostras independentes, pelo qual foram comparadas duas médias provenientes de amostras não pareadas. Para a utilização desse teste, foi realizada análise de variância das amostras e a confirmação que os dados apresentavam distribuição normal. A comparação das variáveis qualitativas entre os grupos de estudo foi realizada por meio da aplicação do teste exato de Fisher.

Para verificar se a presença dos polimorfismos *Xbal*, *PvuII* e *AluI* influencia na presença da doença DTTP, foi realizada, a princípio, a análise exploratória com frequências relativas e absolutas pela variável resposta (doença/não doença), e foi calculado o *Odds Ratio* (OR) bruto. Posteriormente, foi utilizado o modelo de regressão logística múltipla, sendo obtido o OR ajustado (Hosmer & Lemeshow, 2005).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise da população estudada

4.1.1 Fluxo dos pacientes

Inicialmente, duzentos e duas pacientes foram incluídas no estudo, entre novembro de 2013 a dezembro de 2016, sendo 101 alocadas no grupo-caso (DTTP) e 101 no grupo-controle. 26 pacientes foram excluídas do estudo por apresentarem concentrações insuficientes de ADN na amostra coletada, após etapa de purificação do material genético, o que impedia a realização de análise molecular. Um total de 176 amostras foram avaliadas, 84 no grupo-caso (DTTP) e 92 do grupo-controle (Figura 9).

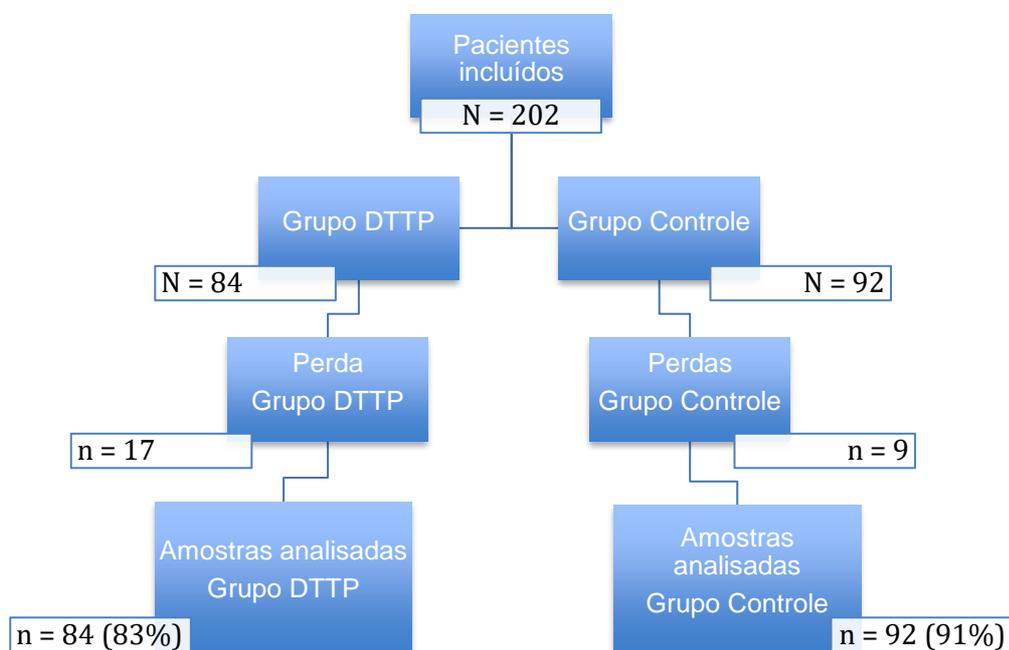


Figura 13 - Fluxograma das etapas do estudo.

4.1.2 Avaliação dos dados demográficos e características clínicas

Foram coletadas informações sobre idade, peso, altura, índice de massa corpórea (IMC), comorbidades clínicas existentes, tempo transcorrido após menopausa e tempo de sintomas de DTTP (exclusivo do Grupo Teste).

Observou-se diferença significativa na média de idade entre os grupos, sendo que pacientes do grupo-caso eram 4,2 anos mais jovens que as do grupo-controle (Tabela 2).

Tabela 2 - Idade (anos) por grupo de estudo.

Grupo	N	Média	D.P	Mínimo	Média	Máximo	valor p
Controle	92	63,7	8,53	47	62,5	84	p<0,001
Caso	84	59,5	7,23	41	59	77	

Constatou-se valores significativamente superiores de IMC nas pacientes do grupo-caso, com diferença de 2,25 Kg/m² quando comparadas ao grupo-controle (Tabela 3).

Tabela 3 - IMC por grupo de estudo.

Grupo	n	Média	D.P	Mínimo	Mediana	Máximo	valor p
Controle	92	26,2	3,7	16	26,6	36,1	p<0,001
Caso	84	28,5	4,1	18,9	28,2	40,3	

O tempo de menopausa também variou significativamente entre os grupos. A diferença média foi de 40 meses (3 anos e 4 meses), sendo mais longo nas mulheres acometidas pela doença (Tabela 4).

Tabela 4 - Tempo de menopausa (meses) por grupo de estudo.

Grupo	n	Média	D.P	Mínimo	Mediana	Máximo	valor p
Controle	92	192,3	113,3	12	180	468	0,013
Caso	84	151,8	100,3	12	138	408	

Além disso, verificou-se que 71,4% das mulheres com DTTP iniciaram os sintomas da doença antes da menopausa. A média de idade no início dos sintomas foi de 46,9 anos; 5,5 anos antes da menopausa. O valor médio de duração da sintomatologia foi de 28,5 meses (Tabela 5).

Tabela 5 - Duração da sintomatologia da doença (meses) para o grupo de mulheres com DTTP.

Grupo	N	Média	D.P	Mínimo	Mediana	Máximo
Caso	84	28,5	4,1	18,9	28,2	40,3

A Tabela 6 apresenta um resumo da prevalência de diferentes comorbidades avaliadas entre os grupos. Não foram encontradas diferenças significativas para hipertensão, dislipidemia e hipotireoidismo. No entanto, observou-se que pacientes do grupo-caso apresentavam maior índice de pé plano prévio (41,6%), em comparação aos controles (10,8%).

Tabela 6 - Frequência absoluta e relativa das variáveis qualitativas entre os grupos de estudo e os respectivos resultados do teste qui-quadrado.

Variáveis	Grupos				valor p
	Caso N=82		Controle N=94		
	n	%	n	%	
Pé plano prévio					
Não	49	58,3	82	89,1	<0.001
Sim	35	41,6	10	10,8	
Hipertensão					
Não	36	42,8	50	54,3	0,127
Sim	48	57,1	42	45,6	
Dislipidemia					
Não	62	73,8	66	71,7	0,758
Sim	22	26,1	26	28,2	
Hipotireoidismo					
Não	78	92,8	81	88	0.2802
Sim	6	7,1	11	11,9	

4.1.3 Equilíbrio Hardy-Weinberg (EHW)

A partir das frequências genóticas dos polimorfismos *PvuII*, *XbaI* e *AluI*, foram calculadas as frequências alélicas "p" e "q", e as frequências esperadas genóticas e, então, foi feito o teste de hipótese.

Para todos os polimorfismos, a hipótese nula de que a população está em equilíbrio Hardy-Weinberg não foi rejeitada. Ou seja, houve evidências de que a amostra está em equilíbrio Hardy-Weinberg (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição genotípica dos SNP *XbaI*, *PvuII* e *AluI* com verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Polimorfismo	Observado		Esperado		Valor-p	EHW	
	n	%	n	%			
<i>PvuII</i>	Pp	32	18,2	41	23,1	0,177	equilíbrio
	Pp	105	59,7	88	49,9		
	PP	39	22,2	48	27,0		
	p	169	48,0				
	P	183	52,0				
<i>XbaI</i>	xx	47	26,7	49	27,9	0,377	equilíbrio
	Xx	92	52,3	88	49,8		
	XX	37	21,0	39	22,2		
	x	186	52,8				
	X	166	47,2				
<i>AluI</i>	AA	19	10,8	22	12,6	0,787	equilíbrio
	GA	87	49,4	81	45,8		
	GG	70	39,8	73	41,5		
	A	125	35,5				
	G	227	64,4				

4.2 Genotipagem

O processo de extração de DNA gerou quantidades satisfatórias de material genético para todas as amostras incluídas no estudo. As frequências dos alelos e dos genótipos estão descritas nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Frequência relativa e absoluta dos alelos por presença ou ausência da doença DTTP.

Polimorfismos (alelos)*	Grupos				Valor- p
	Caso N=82		Controle N=94		
	n	%	n	%	
<i>Xbal</i>					
X ¹	73	43,5	93	50,5	0,200
x ²	95	56,5	91	49,5	
<i>Pvull</i>					
P ¹	89	53,0	94	51,1	0,749
p ²	79	47,0	90	48,9	
<i>Alul</i>					
A ¹	63	37,5	62	10,9	0,504
G ²	105	62,5	122	66,3	

* Alelos: ¹ selvagem (não mutado); ² homocigoto para mutação.

Tabela 9 - Frequência relativa e absoluta dos genótipos por presença ou ausência da doença DTTP.

Polimorfismos (genótipos)*	Grupos				Valor- p
	Caso N=82		Controle N=94		
	n	%	n	%	
<i>Xbal</i>					
XX ¹	19	22,6	18	19,5	0,014
Xx ²	35	41,7	57	62,0	
xx ³	30	35,7	17	18,5	
<i>Pvull</i>					
PP ¹	19	22,6	20	21,7	0,912
Pp ²	51	60,7	54	58,7	
pp ³	14	16,7	18	19,6	
<i>Alul</i>					
AA ¹	9	10,7	10	10,9	0,530
GA ²	45	53,6	42	45,7	
GG ³	30	35,7	40	43,4	

continua

Polimorfismos (genótipos)*	Grupos				conclusão Valor- p
	Caso N=82		Controle N=94		
	n	%	n	%	
<i>XbaI</i>					
XX ¹ + Xx ²	54	64,3	75	81,5	0,011
xx ³	30	35,7	17	18,5	
<i>PvuII</i>					
PP ¹ + Pp ²	70	83,3	74	80,4	0,697
pp ³	14	16,7	18	19,6	
<i>AluI</i>					
AA ¹	9	10,7	10	10,9	1,000
GG ³ + GA ²	75	89,3	82	89,2	

* Genotipagem: ¹ selvagem (não mutado); ² heterozigoto; ³ homozigoto para mutação.

Após a análise estatística pelo método de regressão logística, observou-se que as pacientes portadoras do genótipo xx do SNP *XbaI* tinham risco estimado 2,38 vezes maior de apresentar a DTTP, quando comparadas às portadoras dos genótipos selvagem ou heterozigoto. Já a distribuição tanto dos alelos quanto dos genótipos de *PvuII* e *AluI* não apresentaram diferença significativa entre casos de DTTP e controles. Além disso, foi verificado que mulheres com histórico de pé plano prévio apresentavam risco estimado 5,63 maior de DTTP, em comparação a mulheres sem pé plano (Tabela 10).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O propósito do presente trabalho foi verificar, de maneira inédita, a associação entre a DTTP e as variações nos genes codificantes dos receptores estrogênicos.

A seleção da amostra utilizada em nosso estudo foi baseada na população de maior prevalência da doença, isto é, mulheres com idade superior à quinta década de vida (Giza *et al.*, 2007). Além disso, optou-se por incluir mulheres na menopausa para que não houvesse possível relação dos hormônios sexuais com a gênese da doença.

Não foram incluídas pacientes portadoras de comorbidades reconhecidamente associadas à etiopatogenia dessa tendinopatia (Downey *et al.*, 1988; Myerson *et al.*, 1989; Deland *et al.*, 2005). O grupo-controle, de modo geral, respeitou os mesmos critérios de inclusão do grupo-caso, exceto pela ausência da tendinopatia em questão.

O perfil demográfico de casos e controles foi similar. Em ambos os grupos de nossa amostragem, foi verificado que não houve associação entre a presença das comorbidades mais prevalentes – hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e o hipotireoidismo – e a DTTP.

Apesar das heterogeneidades estatisticamente significantes encontradas, tanto na média da idade quanto no IMC, acreditamos que o valor absoluto destas diferenças não tenha importância clínica suficiente para invalidar a homogeneidade e similaridade de ambos os grupos. A média de idade das pacientes, tanto de casos como de controles, foi similar à descrita previamente na literatura (Kohls-Gatzoulis *et al.*, 2009). Além disso, a discrepância de valores médios de IMC encontrada entre os grupos não foi suficiente para alterar a classificação de obesidade da Organização Mundial da Saúde, ambos classificados como sobrepeso.

A associação entre pé plano e DTTP já é reconhecidamente descrita na literatura (Deland, 2008). Em nossa amostra, os resultados observados foram coincidentes aos existentes, uma vez que constatamos associação significativa entre a presença do desfecho secundário “presença pé plano prévio” e a DTTP, com estimativa de risco de 5,63 vezes.

Além disso, a avaliação por meio da regressão logística ajustada não evidenciou resultados com significância estatística entre a presença do pé plano prévio com os polimorfismos analisados no estudo, o que a descartou como eventual fator de confusão.

Ao todo, foram coletadas amostras do material biológico (saliva) de 202 indivíduos. O bochecho foi escolhido como a técnica de obtenção de material genético das participantes por representar método pouco invasivo e pela facilidade na obtenção do ADN (Godoy-Santos *et al.*, 2014). Ao todo, foram analisadas amostras de 176 indivíduos (88% total, sendo 84 de pacientes com a lesão degenerativa do TTP e 92 de controles).

Em razão da baixa concentração de material genético, 26 amostras (12%) não puderam ser analisadas por meio das técnicas escolhidas. Apesar disso, os resultados demonstraram que o método de extração e amplificação do ADN utilizado foi adequado. As técnicas de *PCR-RFLP* e a escolha das enzimas de restrição utilizadas foram eficientes na identificação dos genótipos dos polimorfismos SNP *PvuII*, *XbaI* e *AluI* dos genes do RE1 e RE2, respectivamente.

Após a análise molecular das amostras, constatamos que o genótipo AA do SNP *AluI* do RE2 estava presente em 10,8% de pacientes do grupo-caso e 10,7%, dos controles, o que acarretou um risco estimado de 1,27, porém sem significância estatística. Resultados semelhantes foram encontrados para o genótipo pp do SNP *PvuII*, encontrado em 19,5% dos casos e 16,6% dos controles, além de um OR 0,51 (IC95% 0,20 - 1,29), sem significância estatística.

A presença do genótipo xx do SNP *XbaI* do RE1 no grupo-caso (35,7%) apresentou valores estatisticamente significante maiores do que nos controles (18,4%), com risco estimado de 2,38 (IC95% 1,09 - 5,19) em desenvolver a

doença. Esta diferença estatisticamente significativa demonstra, de maneira inédita, a associação entre o polimorfismo genético do RE1 e a tendinopatia do TTP.

As frequências de todos os polimorfismos genéticos estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, demonstrando, assim, que a herança genética destes polimorfismos na população do estudo se manteve constante, isto é, não sofreu a interferência de possíveis fatores evolutivos e apresentou distribuição genotípica randômica.

A associação dos polimorfismos dos RE1 e RE2 com patologias em diversos sistemas, tais como o cardiovascular, uroginecológico, neurológico e locomotor já foi comprovada na literatura (Alcazar *et al.*, 2010). Estudos recentes também constataram essa associação com tendinopatia, principalmente de músculos do manguito rotador (SMR). Motta *et al.* (2014) constataram a associação de uma grande variedade de polimorfismos com a tendinopatia do manguito rotador, dentre eles, a variação rs1676303 do RE2, da qual o genótipo CC conferia proteção. Teerlink *et al.* (2014) encontraram resultados semelhantes. Constataram que a presença de mutação em um alelo específico do SNP rs17583842 do RE2 conferia uma estimativa de risco significativamente aumentada de 1,41 para o desenvolvimento da tendinopatia do manguito rotador.

Os mecanismos moleculares pelos quais esses polimorfismos modificam a produção e atividade dos receptores de estrogênio, no entanto, ainda não são claros na literatura. Diversas etapas da transcrição gênica dos receptores poderiam ser influenciadas por esses polimorfismos, incluindo a estabilidade da ligação genômica do ADN a fatores de transcrição, o processo de *splicing* para a subtração dos íntrons durante a formação do ARN e a estruturação do ARNm e sua capacidade de processamento (Nott *et al.*, 2008).

Dessa forma, a presença dessas variações seria capaz de interferir não só na expressão gênica, como também na síntese proteica, o que poderia provocar transformações negativas ou positivas na expressão e atuação dos receptores estrogênicos (Nott *et al.*, 2008).

Sabe-se que a degeneração tendínea representa um processo multifatorial e que diversos fatores extrínsecos e intrínsecos estão envolvidos (Abate *et al.*, 2009; Oliva *et al.*, 2016). Até o presente momento, as evidências científicas apresentadas são controversas e não elucidaram totalmente a atuação do estrogênio no metabolismo tendíneo.

Bridgeman *et al.* (2010) foram os primeiros autores que demonstraram a expressão dos RE1 e RE2 nas células do tendão tibial posterior. Ao avaliarem pacientes com DTTP e controles, demonstraram possível influência estrogênica nesses tendões, com alterações teciduais dependentes do nível sérico hormonal.

Estudos experimentais em animais investigaram o papel dos hormônios sexuais na composição da MEC. Circi *et al.* (2009) observaram que a deficiência de estrogênio em ratos ooforectomizados afetava negativamente o metabolismo tendíneo, com diminuição nas taxas de proliferação de tenócitos, alteração arquitetural das fibras colágenas e diminuição do potencial de cicatrização.

Torricelli *et al.* (2013) evidenciaram achados semelhantes em ratos. Constataram que a carência hormonal estava relacionada à diminuição da capacidade de cicatrização tendínea e à reciclagem de componentes da MEC tendínea. Aydin *et al.* (2013) verificaram índices de apoptose elevados em células ósseas, musculares e tendíneas de ratos ooforectomizados. Huisman *et al.* (2014) constataram menor expressão gênica de componentes da MEC em animais ooforectomizados.

Estudos clínicos em humanos também verificaram a correlação entre níveis séricos de estrogênio e o desenvolvimento de tendinopatias. Cook *et al.* (2007) verificaram que mulheres menopausadas que receberam a reposição hormonal apresentaram menores taxas de espessamento do tendão calcâneo em relação aos controles. Hansen e Kongsgaard *et al.* (2009) observaram que, no grupo que recebeu a TRH, a taxa de síntese de colágeno e o número de fibras tendíneas de espessura média foram maiores do que o grupo-controle.

Mais recentemente, Hansen e Kjaer (2014) (Hansen & Kjaer 2014) constataram que a reposição do estrogênio reduziu o *turnover* proteico da musculatura e aumentou a sua resistência ao exercício. Além disso, verificaram que o hormônio também diminuía a rigidez tendínea nas mulheres na pós-menopausa.

Estudos com mulheres em fase reprodutiva demonstram achados divergentes com relação à ação estrogênica no sistema musculoesquelético. Diferentemente do possível papel protetor do hormônio demonstrado nas mulheres menopausadas submetidas à TRH, evidências apontaram para atuação deletéria do estrogênio nos tendões de mulheres jovens. Magnusson *et al.* (2007) constataram que tendões de mulheres na vida reprodutiva, quando comparados a pacientes masculinos de mesma faixa etária, apresentavam menores índices de neoformação de tecido conectivo, de resistência e capacidade de resposta a cargas mecânicas.

Hansen e Miller *et al.* (2009) evidenciaram que o uso de contraceptivos orais de estrogênio acarretou em menor produção de colágeno e menor capacidade reparativa a microlesões tendíneas. Atribuíram ao estrogênio efeito inibitório na síntese colágena, por meio de influência na biodisponibilidade de IGF-1, importante fator no metabolismo de fibroblastos.

Esses trabalhos nos permitem inferir que a ação estrogênica na fase reprodutiva da mulher poderia alterar o metabolismo dos tenócitos, ao enfraquecê-los por meio da redução da síntese de colágeno e, posteriormente, desencadear sintomatologia durante o período perimenopausal. Os resultados encontrados em nosso estudo vão ao encontro dessa afirmativa, uma vez que as pacientes apresentaram o início dos sintomas da DTTP, em média, 5,5 anos antes da menopausa.

O nosso trabalho apresenta limitações inerentes ao seu desenho – estudo caso-controle – que nos impedem de determinar a relação de causa-efeito entre a DTTP e as variações genéticas dos RE envolvidos no metabolismo do estrogênio. Contudo, foi capaz de encontrar, de maneira inédita, a associação entre essa tendinopatia e a ação hormonal do estrogênio, que, por meio da expressão de múltiplos polimorfismos genéticos

de seus receptores, poderia atuar como fator de risco para o desenvolvimento da doença.

Outra restrição é a possível existência de fatores adicionais de confusão, não considerados em nossa análise, que poderiam alterar as associações encontradas. O efeito de cada polimorfismo genético pode ser tamponado por outros polimorfismos presentes no gene codificante do RE ou mesmo por polimorfismos de outros genes que participam na complexa rede de interações de doenças influenciadas pela atuação hormonal. Essa situação pode ocorrer quando múltiplos loci gênicos atuam em conjunto na fisiopatogenia de uma doença.

Como última limitação, o fato de que os resultados encontrados podem não ser reproduzíveis em populações etnicamente distintas, uma vez que a etnia pode influenciar na frequência dos polimorfismos genéticos (Lin *et al.*, 2007).

Por fim, os resultados do estudo, além de elucidar mais um possível fator de risco associado à doença, permitem a consideração de que o conhecimento das variações genéticas associadas à DTTP poderia facilitar na identificação de indivíduos geneticamente suscetíveis ao desenvolvimento da doença. Futuramente, o entendimento ampliado de outros possíveis marcadores genéticos associados com o desenvolvimento da DTTP poderá garantir condições para a criação de estratégias de prevenção, *screening* ou mesmo de terapêutica aos pacientes predispostos (Lin *et al.*, 2007).

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O polimorfismo *XbaI* (rs 9340799) do gene codificante do receptor de estrogênio alfa está associado ao desenvolvimento da tendinopatia primária do tendão do músculo tibial posterior na população estudada.

Indivíduos portadores do genótipo xx do SNP *XbaI* apresentam risco estimado de 2.383 maior de desenvolver a tendinopatia.

O polimorfismo *PvuII* (rs 2234693) do gene codificante do receptor de estrogênio alfa não apresentou associação com o desenvolvimento da tendinopatia primária do tendão tibial posterior na população estudada.

O polimorfismo *AluI* (rs 4986938) do gene codificante do receptor de estrogênio beta não apresentou associação com o desenvolvimento da tendinopatia primária do tendão tibial posterior na população estudada.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A - Comissão Científica do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o protocolo nº 971

DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paul
COMISSÃO CIENTÍFICA

IDENTIFICAÇÃO

PROTOCOLO IOT Nº 971

Pesquisador Responsável: Dr. Alexandre Leme Godoy dos Santos

Pesquisador Executante: Dr. Pedro Augusto Pontin

Título: Análise do polimorfismo dos receptores de estrógeno alfa (RE1) e beta (RE2) na fisiopatogenia da insuficiência do tendão tibial posterior no gênero feminino.

Grau de Pesquisa: Projeto Regular

APRECIÇÃO GERAL DA PROPOSTA

1.1.1 2º PARECER

1.1.2 Cálculo da amostra corrigido. Serão utilizados pacientes que terão a ressonância magnética realizada habitualmente no grupo de pé para investigação de outras patologias. Apto pela aprovação do projeto.

1.1.3 RELATOR

1.1.4 Comissão Científica

1.1.5 27.03.2013

7.2 Anexo B - Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o nº 10166-2013



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ANÁLISE DO POLIMORFISMO DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO ALFA (RE1) E BETA (RE2) NA FISIOPATOGENIA DA INSUFICIÊNCIA DO TENDÃO TIBIAL POSTERIOR NO GÊNERO FEMININO

Pesquisador Responsável: Alexandre Leme Godoy dos Santos **Versão:** 1

Pesquisador Executante: Pedro Augusto Pontin **CAAE:** 11210213.2.0000.0068

Co-autores: Tulio Diniz Fernandes, Edmund Chada Baracat, Maria Cristina Leme Godoy dos Santos.

Instituição: HCFMUSP

Departamento: ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10166

Número do Parecer: 268.419

Data da Relatoria: 08/05/2013

Apresentação do Projeto: A proposta do estudo "Análise do polimorfismo dos receptores de estrógeno alfa (RE1) e beta (RE2) na fisiopatogenia da insuficiência do tendão tibial posterior no gênero feminino" está bem justificada na introdução, os objetivos são claros e a casuística calculada para responder adequadamente a pergunta do trabalho.

Objetivo da Pesquisa: Investigar a associação de polimorfismos dos genes promotores dos receptores de estrógeno alfa (RE1) e beta (RE2) e a tendinopatia primária do tibial posterior em mulheres, durante o período perimenopausal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há benefícios diretos ao paciente, tendo em vista tratar-se de uma hipótese de que a alteração genética possa estar relacionada na fisiopatogenia da insuficiência do tendão tibial posterior no gênero feminino. Entretanto, julgamos haver benefício indireto aos pacientes, caso exista relação que explique a fisiopatogenia da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O estudo está claramente justificado e desenhado e utilizará metodologia genética clássica aplicada em material (saliva) com coleta pouco invasiva.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequar cronograma de realização, pois consta início de coleta de amostras sem aprovação prévia do comitê de ética.

Recomendações: Adequar cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Há pendências a serem observadas pelo pesquisador

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 10 de Maio de 2013

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovidio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.tnb
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

7.3 Anexo C - Termo de outorga do auxílio Fapesp.



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

Anexo II do Termo de Outorga: Necessidade de apoio institucional (pessoal, infraestrutura e serviços) para perfeito andamento do projeto e compromisso da Instituição Sede

Título do Projeto: Análise de polimorfismos nos receptores e na via metabólica de estrogênio, em mulheres pós-menopáusicas com tendinopatia do Tibial posterior.
Bolsista: (somente para processos de bolsas no país)
Pesquisador Responsável e/ou Orientador/Supervisor: Dr. Alexandre Leme Godoy José Santos
Instituição Sede: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina do Estado de São Paulo - HCFMUSP.
<p>1) Pessoal</p> <p>1.a) A Instituição Sede oferece serviços técnicos ou pessoal técnico de apoio ao projeto de pesquisa proposto? Recursos humanos do DOT-FMUSP e do IOT-HCFMUSP</p>
<p>1.b) A Instituição Sede oferece serviços de administração de projetos, incluindo contabilidade, prestação de contas, compras e auxílio na preparação de relatórios científicos, entre outros? recursos humanos do DOT-FMUSP e do IOT-HCFMUSP</p>
<p>1.c) A Instituição Sede oferece serviços de gestão de projeto de pesquisa (montagem de solicitações de financiamento, agendamento de reuniões, acompanhamento, supervisão de equipamentos, contatos com visitantes, representação em eventos, etc.)? recursos humanos do DOT-FMUSP e do IOT-HCFMUSP</p>
<p>1.d) O projeto, caso aprovado, demandará pessoal adicional, a ser providenciado pela Instituição Sede em prazo que não comprometa o andamento do projeto? Em caso afirmativo, por favor, detalhe. Não necessário</p>

2) Instalações

2.a) O projeto, caso aprovado, demandará instalações (ou alterações de instalações) adicionais, a serem providenciadas pela Instituição Sede em prazo que não comprometa o andamento do projeto? Em caso afirmativo, por favor, detalhe.

Instalações e infra-estrutura do DOT-FMUSP e do IOT-HCFMUSP

3) Serviços

3. a) O projeto, caso aprovado, demandará serviços adicionais necessários, a serem providenciados pela Instituição Sede em prazo que não comprometa o andamento do projeto? Em caso afirmativo, por favor, detalhe

Não necessário

Data: São Paulo, 27 de Abril de 2015

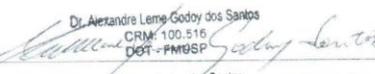
Declaro o compromisso da Instituição Sede em prover o apoio descrito nos itens acima:


PROFESSORA ELOISA BONFÁ
Diretora Clínica do HCFMUSP

Carimbo e assinatura do Dirigente da Instituição Sede

Declaro/Declaramos que os itens listados acima são suficientes para a perfeita execução do projeto apresentado à FAPESP sob minha/nossa responsabilidade:

Assinatura do Bolsista
(somente para processos de bolsa no país)


Dr. Alexandre Leme Godoy dos Santos
CRM: 100.516
DOT - FMUSP

Assinatura do Pesquisador Responsável e/ou Orientador Supervisor:

7.4 Anexo D - Termo de consentimento livre e esclarecido.

Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo - HCFMUSP

Termo de consentimento livre e esclarecido

Dados de identificação do sujeito da pesquisa

Nome:

Documento de identidade nº :

Sexo : M F X

Data de nascimento:/...../.....

Endereço:

nº :

Complemento:

Bairro:

Cidade:

Estado:

CEP:

Telefone: DDD ()

-

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: " Análise de polimorfismos nos receptores de estrogênio alfa e beta em mulheres pós-menopáusicas com tendinopatia do tendão do músculo tibial posterior."

Pesquisador : Dr. Alexandre Leme Godoy dos Santos

Cargo/Função: Médico Assistente Doutor

Inscrição no Conselho Regional de Medicina de São Paulo nº 100516

Unidade do HCFMUSP: IOT

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

Risco Mínimo X Risco médio

Risco baixo Risco maior

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2-4 anos

Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo – HCFMUSP

As lesões dos tendões por degeneração têm explicações ligadas a traumatismos, a problemas de circulação sanguínea e a problemas dos nervos. Muitas doenças que levam à degeneração dos tendões, no entanto, permanecem sem uma explicação médica adequada; essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária nesse trabalho, que visa esclarecer os motivos que causam as degenerações dos tendões do pé. Por esse motivo, a possibilidade de causas genéticas para essas lesões precisa ser estudada e o objetivo desse trabalho é investigar a frequência dos genes em pacientes com diagnóstico de lesão do tendão tibial posterior, para verificar a possível relação entre o polimorfismo genético e o desenvolvimento dessa doença.

O estudo será feito com um único exame por meio de coleta simples de saliva. As pacientes selecionadas farão bochecho com água e açúcar e, em seguida, cuspirão em um recipiente plástico pequeno. A leitura das informações genéticas presentes na saliva é exame de alta tecnologia não rotineiro no nosso meio. Não haverá outros exames ou procedimentos invasivos. Não haverá desconfortos ou riscos na coleta e execução do exame.

Em relação aos benefícios para os participantes, não há benefício direto para o participante; trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que fatores genéticos interfiram na degeneração dos tendões.

Com o estudo poderemos concluir a presença de algum benefício aas pacientes.

Está garantido o acesso, em qualquer etapa do estudo, aos achados da pesquisa, ao seu prontuário e aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo são o Dr. Alexandre Leme Godoy dos Santos e o Dr. Pedro Augusto Pontin, que podem ser encontrados no endereço Rua Ovídio Pires de Campos, nº 333, 3º andar, sala da secretaria de graduação, Instituto de Ortopedia e Traumatologia da USP, São Paulo, SP, Brasil e, pelo telefone 2661-6888.

Se alguém tiver alguma consideração a fazer ou dúvida a esclarecer sobre a ética da pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – ou pelo telefone: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

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

É garantido às participantes o direito de confidencialidade das informações obtidas no estudo, as quais serão analisadas em conjunto com as de outras pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhuma paciente.

É garantido o direito de as participantes serem mantidas atualizadas sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para a participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Há compromisso absoluto do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Através desse termo de consentimento, a participante declara ter sido suficientemente informada a respeito das informações que leu ou que foram lidas para ela, descrevendo o estudo " Análise de polimorfismos nos receptores de estrogênio alfa e beta em mulheres pós-menopáusicas com tendinopatia do tendão do músculo tibial posterior."

Declara, ainda, que discutiu com os médicos Dr. Alexandre Leme Godoy dos Santos e/ou Dr. Pedro Augusto Pontin sobre a decisão em participar nesse trabalho. Afirma que ficaram claros quais seriam os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Afirma que ficou claro que a participação é isenta de despesas e que terá a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Sendo assim, a paciente concorda voluntariamente em participar desse trabalho e poderá retirar o consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

São Paulo, / /

Assinatura da paciente

Assinatura da testemunha

(Somente para o responsável do projeto)

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

São Paulo, / /

Dr. Pedro Augusto Pontin
CRM /SP 125.105

7.5 Anexo E - Protocolo de Purificação do ADN - QiAamp®DNA Mini and Blood Mini Handbook (2ª edition, dec 2007, Qiagen Sample & Assay Technologies - pp. 27-29)

- 1) Adicionar 200µl de TAL à amostra.
- 2) Adicionar 200µl de etanol (96-100%). Se o volume original da amostra > 200µl, aumentar proporcionalmente o volume de etanol. Vortexar por pulso por 15 s. Centrifugar brevemente a amostra.
- 3) Aplicar a amostra cuidadosamente na coluna em um tubo de 2ml sem molhar a borda. Fechar a tampa e centrifugar à 6000xg (8000rpm) por 1 min. Transferir a coluna para tubo de coleta de 2ml (kit). Descartar o tubo e o filtrado.
- 4) Abrir cuidadosamente a tampa. Adicionar 500µl de TAW1 sem molhar a borda. Fechar a tampa e centrifugar a 6000xg (8000rpm) por 1min. Transferir a coluna para tubo de coleta de 2ml (kit). Descartar o tubo e o filtrado.
- 5) Abrir cuidadosamente a tampa. Adicionar 500µl de TAW2 sem molhar a borda. Fechar a tampa e centrifugar à velocidade máxima por 3min.
- 6) Transferir a coluna para tubo novo de 2ml. Descartar o tubo e o filtrado. Centrifugar a velocidade máxima por 1min.
- 7) Transferir a coluna para tubo novo de 1,5ml. Abrir a tampa e adicionar 200µl de TAE ou água destilada. Incubar a temperatura ambiente por 1 min (Incubação por 5 min aumenta o rendimento de ADN). Centrifugar a 6000xg (8000rpm) por 1 min (um segundo passo de eluição com 200µl de TAE, aumenta o rendimento de DNA em 15%). Para amostras < 1 µg de DNA, eluir com 50 µl de TAE ou água destilada.
- 8) Armazenar a amostra a -20 °C.

7.6 Anexo F - Protocolos de Digestão para enzimas Thermoscientific (sem adição do tampão SAM):

- 1) 2 uL do Tampão de digestão (específico para cada enzima).
- 2) 0,5 uL de enzima (até 1U para cada 1 ug de ADN).
- 3) 1 ug de ADN (fragmento da PCR).
- 4) H2O padrão MilliQ em volume suficiente para completar 20 uL de reação final.
- 5) Correr todo o volume em gel de agarose (1 – 3% dependendo do tamanho dos fragmentos gerados, adaptar para a enzima em estudo).

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Abate M, Silbernagel KG, Siljeholm C, Di Iorio A, De Amicis D, et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):235.

Abrahams Y, Laguette MJ, Prince S, Collins M. Polymorphisms within the COL5A1 3'-UTR that alters mRNA structure and the MIR608 gene are associated with Achilles tendinopathy. *Ann Hum Genet.* 2013 May;77(3):204-14.

Aidar M, Line SRP. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J.* 2007;18(2):148-52.

Alcazar LP, Arakaki PA, Godoy-Santos A, Santos M. Estrogen receptor polymorphism and its relationship to pathological process. *Am J Med Sci.* 2010 Aug;340(2):128-32.

Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med.* 2006 Aug;27(4):299-402.

Aydin A, Kenar H, Atmaca H, Alici T, Gacar G, Muezzinoğlu ÜS, et al. The short and longterm effects of estrogen deficiency on apoptosis in musculoskeletal tissues: an experimental animal model study. *Arch Iran Med.* 2013 May;16(5):271-6.

Bare AA, Haddad SL. Tenosynovitis of the posterior tibial tendon. *Foot Ankle Clin.* 2001 Mar;6(1):37-66.

Barone I, Brusca L, Fuqua SAW. Estrogen receptor mutations and changes in downstream gene expression and signaling. *Clin Cancer Res.* 2010 May 15;16(10):2702-8.

Baroneza JE, Godoy-Santos A, Ferreira Massa B, Boçon de Araujo Munhoz F, Diniz Fernandes T, Leme Godoy dos Santos MC. MMP-1 promoter genotype and haplotype association with posterior tibial tendinopathy. *Gene.* 2014 Sep 1;547(2):334-7.

Bluman EM, Title CI, Myerson MS. Posterior tibial tendon rupture: a refined classification system. *Foot Ankle Clin.* 2007 Jun;12(2):233-49.

Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 May;86(5):2309-14.

Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 2003 Jul;200(4):423-8.

Bridgeman JT, Zhang Y, Donahue H, Wade AM, Juliano PJ. Estrogen receptor expression in posterior tibial tendon dysfunction: a pilot study. *Foot Ankle Int*. 2010 Dec;31(12):1081-4.

Bryant AL, Clark RA, Bartold S, Murphy A, Bennell KL, Hohmann E, et al. Effects of estrogen on the mechanical behavior of the human Achilles tendon in vivo. *J Appl Physiol* (1985). 2008 Oct;105(4):1035-43.

Burgess KE, Pearson SJ, Onambélé GL. Menstrual cycle variations in oestradiol and progesterone have no impact on in vivo medial gastrocnemius tendon mechanical properties. *Clin Biomech* (Bristol, Avon). 2009 Jul;24(6):504-9

Burgess KE, Pearson SJ, Onambélé GL. Patellar tendon properties with fluctuating menstrual cycle hormones. *J Strength Cond Res*. 2010 Aug;24(8):2088-95.

Carlson CS, Loeser RF, Jayo MJ, Weaver DS, Adams MR, Jerome CP. Osteoarthritis in cynomolgus macaques: a primate model of naturally occurring disease. *J Orthop Res*. 1994 May;12(3):331-9.

Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, Li W, Meyer CA, Szary AJ, et al. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell*. 2005 Jul 15;122(1):33-43.

Chuen FS, Chuk CY, Ping WY, Nar WW, Kim HL, Ming CK. Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. *J Histochem Cytochem*. 2004 Sep;52(9):1151-7..

Circi E, Akpınar S, Balcık C, Bacanlı D, Guven G, Akgun RC, et al. Biomechanical and histological comparison of the influence of oestrogen deficient state on tendon healing potential in rats. *Int Orthop*. 2009;33(5):1461-6.

Claassen H, Schünke M, Kurz B. Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-induced damage. *Cell Tissue Res*. 2005 Mar;319(3):439-45.

Cook JL, Bass SL, Black JE. Hormone therapy is associated with smaller Achilles tendon diameter in active post-menopausal women. *Scand J Med Sci Sports*. 2007 Apr;17(2):128-32.

Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med*. 2013 Mar;19(3):197-209.

Deland JT. Adult-acquired flatfoot deformity. *J Amer Acad Orthop Surg*. 2008;16(7):399-406.

Deland JT, de Asla RJ, Sung I-H, Ernberg LA, Potter HG. Posterior tibial tendon insufficiency: which ligaments are involved? *Foot Ankle Int Am Orthop Foot Ankle Soc.* 2005;26:427–35.

Dempster DW, Lindsay R. Pathogenesis of osteoporosis. *Lancet.* 1993 Mar 27;341(8848):797–801.

De Zwart DF, Davidson JS. Rupture of the posterior tibial tendon associated with fractures of the ankle. A report of two cases. *J Bone Joint Surg Am.* 1983;65(2):260–2.

Docheva D, Müller SA, Majewski M, Evans CH. Biologics for tendon repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Apr; 2015 Oct 12];84:222–39.

Downey DJ, Simkin PA, Mack LA, Richardson ML, Kilcoyne RF, Hansen ST. Tibialis posterior tendon rupture: a cause of rheumatoid flat foot. *Arthritis Rheum.* 1988 Mar;31(3):441–6.

El Khoury L, Posthumus M, Collins M, Handley CJ, Cook J, Raleigh SM. Polymorphic variation within the ADAMTS2, ADAMTS14, ADAMTS5, ADAM12 and TIMP2 genes and the risk of Achilles tendon pathology: a genetic association study. *J Sci Med Sport.* 2013 Nov;16(6):493–8.

Erduran M, Altinisik J, Meric G, Ates O, Ulusal AE, Akseki D. Is Sp1 binding site polymorphism within COL1A1 gene associated with tennis elbow? *Gene.* 2014 Mar 10;537(2):308–11.

Esposito T, Uccello R, Caliendo R, Di Martino GF, Gironi Carnevale UA, Cuomo S, et al. Estrogen receptor polymorphism, estrogen content and idiopathic scoliosis in human: A possible genetic linkage. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;116:56–60.

Faibish D, Ott SM, Boskey AL. Mineral changes in osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 2006 Feb;443:28–38.

Farooq A. Structural and functional diversity of estrogen receptor ligands. *Curr Top Med Chem.* 2015 Jan;15(14):1372–84.

Foster BP, Morse CI, Onambele GL, Williams AG. Human COL5A1 rs12722 gene polymorphism and tendon properties in vivo in an asymptomatic population. *Eur J Appl Physiol.* 2014 Mar 19;114(7):1393–402.

Frey C, Shereff M, Greenidge N. Vascularity of the posterior tibial tendon. *J Bone Jt Surg.* 1990;72(6):84-8.

Funk DA, Cass JR JK. Acquired adult flat foot secondary to posterior tibial tendon pathology. *J Bone Joint Surg Am.* 1986;68(1):95–102.

Garcia-Closas M, Chanock S. Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor status. *Clin Cancer Res.* 2008 Dec 15;14(24):8000–9.

Ghormley RK, Spear IM. Anomalies of the posterior tibial tendon; a cause of persistent pain about the ankle. *AMA Arch Surg*. 1953 Apr;66(4):512–6.

Giblin MM. Ruptured tibialis posterior tendon associated with a closed medial malleolar fracture. *Aust N Z J Surg*. 1980 Feb;50(1):59–60.

Gisslén K, Alfredson H. Neovascularisation and pain in jumper's knee: a prospective clinical and sonographic study in elite junior volleyball players. *Br J Sports Med*. 2005 Jul;39(7):423-8-8..

Godoy-Santos A, Cunha M V., Ortiz RT, Fernandes TDTD, Mattar R, dos Santos MCLG. MMP-1 promoter polymorphism is associated with primary tendinopathy of the posterior tibial tendon. *J Orthop Res*. 2013;31(7):1103–7.

Godoy-Santos A, Ortiz RT, Junior RM, Fernandes TD, Santos MCLG, Mattar Junior R, et al. MMP-8 polymorphism is genetic marker to tendinopathy primary posterior tibial tendon. *Scand J Med Sci Sport*. 2014 Feb;24(1):220–3.

Godoy-Santos AL, Trevisan R, Fernandes TD, Santos MCLG dos. Association of MMP-8 polymorphisms with tendinopathy of the primary posterior tibial tendon: a pilot study. *Clinics*. 2011 Jan;66(9):1641–3.

Goji K. Twenty-four-hour concentration profiles of gonadotropin and estradiol (E2) in prepubertal and early pubertal girls: the diurnal rise of E2 is opposite the nocturnal rise of gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Dec;77(6):1629–35.

Goldner JL, Keats PK, Bassett FH, Clippinger FW. Progressive talipes equinovagum due to trauma or degeneration of the posterior tibial tendon and medial plantar ligaments. *Orthop Clin North Am*. 1974 Jan;5(1):39–51.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 1986 Jan;320(6058):134–9.

Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *English J*. 2002 Jan 31;346(5):340–52.

Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*. 1999 Dec;140(12):5566–78.

Hansen M, Couppe C, Hansen CSE, Skovgaard D, Kovanen V, Larsen JO, et al. Impact of oral contraceptive use and menstrual phases on patellar tendon morphology, biochemical composition, and biomechanical properties in female athletes. *J Appl Physiol*. 2013;114(8):998–1008.

Hansen M, Kongsgaard M, Holm L, Skovgaard D, Magnusson SP, Qvortrup K, et al. Effect of estrogen on tendon collagen synthesis, tendon structural characteristics, and biomechanical properties in postmenopausal women. *J Appl Physiol*. 2009 Apr;106(4):1385–93.

Hansen M, Kjaer M. Influence of sex and estrogen on musculotendinous protein turnover at rest and after exercise. *Exerc Sport Sci Rev*. 2014 Oct;42(4):183–92.

Hansen M, Koskinen SO, Petersen SG, Doessing S, Frystyk J, Flyvbjerg A, et al. Ethinyl oestradiol administration in women suppresses synthesis of collagen in tendon in response to exercise. *J Physiol*. 2008;586:3005–16.

Hansen M, Miller BF, Holm L, Doessing S, Petersen SG, Skovgaard D, et al. Effect of administration of oral contraceptives in vivo on collagen synthesis in tendon and muscle connective tissue in young women. *J Appl Physiol*. 2009 Apr;106(4):1435–43.

Hay M, Patricios J, Collins R, Branfield A, Cook J, Handley CJ, et al. Association of type XI collagen genes with chronic Achilles tendinopathy in independent populations from South Africa and Australia. *Br J Sports Med*. 2013 Apr 27;47(9):569–74.

Holmes GB, Lin J. Etiologic factors associated with symptomatic achilles tendinopathy. *Foot Ankle Int*. 2006 Nov;27(11):952–9.

Holmes GB, Mann RA. Possible epidemiological factors associated with rupture of the posterior tibial tendon. *Foot Ankle*. 1992 Feb;13(2):70–9.

Hosmer DW, Lemeshow S. Multiple logistic regression. *Applied logistic regression*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2005. p. 31–46.

Huisman ES, Andersson G, Scott A, Reno CR, Hart DA, Thornton GM. Regional molecular and cellular differences in the female rabbit Achilles tendon complex: potential implications for understanding responses to loading. *J Anat*. 2014;224(5):538–47.

Huttunen TT, Kannus P, Rolf C, Felländer-Tsai L, Mattila VM. Acute achilles tendon ruptures: incidence of injury and surgery in Sweden between 2001 and 2012. *Am J Sports Med*. 2014 Oct;42(10):2419–23.

Jahss MH. Spontaneous rupture of the tibialis posterior tendon: clinical findings, tenographic studies, and a new technique of repair. *Foot Ankle*. 1982 Jan;3(3):158–66.

Johnson KA, Strom DE. Tibialis posterior tendon dysfunction. *Clin Orthop Relat Res*. 1989;(239):196–206.

Jozsa L, Balint JB, Kannus P, Reffy A, Barzo M. Distribution of blood groups in patients with tendon rupture. An analysis of 832 cases. *J Bone Joint Surg Br.* 1989 Mar;71(2):272–4

Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10(6):312–20.

Katzenellenbogen BS, Montano MM, Le Goff P, Schodin DJ, Kraus WL, Bhardwaj B, et al. Antiestrogens: mechanisms and actions in target cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995 Jun;53(1–6):387–93.

Kendall B, Eston R. Exercise-induced muscle damage and the potential protective role of estrogen. *Sports Med.* 2002 Jan;32(2):103–23.

Kettelkamp DB, Alexander HH. Spontaneous rupture of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg Am.* 1969 Jun 1;51(4):759–64.

Key JA. Partial rupture of the tendon of the posterior tibial muscle. *J Bone Joint Surg Am;* 1953 Oct 1;35–A(4):1006–8.

Kidner F. The pre-hallux (accessory scaphoid) in its relation to flat-foot. *J Bone Jt Surg.* 1929;11(4):831–837.

Kjaer M, Langberg H, Heinemeier K, Bayer ML, Hansen M, Holm L, et al. From mechanical loading to collagen synthesis, structural changes and function in human tendon. *Scand J Med Sci Sports.* 2009 Aug;19(4):500–10.

Klinge CM. Estrogen regulation of microRNA expression. *Curr Genomics.* 2009 May;10(3):169–83.

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.* 2016 Jun 1.

Kohls-Gatzoulis J, Angel JC, Singh D, Haddad F, Livingstone J, Berry G. Tibialis posterior dysfunction: a common and treatable cause of adult acquired flatfoot. *BMJ.* 2004 Dec 4;329(7478):1328–33.

Kohls-Gatzoulis J, Woods B, Angel JC, Singh D. The prevalence of symptomatic posterior tibialis tendon dysfunction in women over the age of 40 in England. *Foot Ankle Surg.* 2009;15:75–81.

Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol.* 2001;15(12):2057–63.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 11;93(12):5925–30.

Kwon Y-S, Garcia-Bassets I, Hutt KR, Cheng CS, Jin M, Liu D, et al. Sensitive ChIP-DSL technology reveals an extensive estrogen receptor alpha-binding program on human gene promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20;104(12):4852–7.

Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2006 Feb;194(2 Suppl):S3-11.

Langenskiöld A. Chronic non-specific tenosynovitis of the tibialis posterior tendon. *Acta Orthop Scand*. 1967 Jan;38(3):301–5.

Lin PI, Vance JM, Pericak-Vance MA, Martin ER. No gene is an island: the flip-flop phenomenon. *Am J Hum Genet*. 2007 Mar;80(3):531–8.

Liu SH, Al-Shaikh RA, Panossian V, Finerman GA, Lane JM. Estrogen affects the cellular metabolism of the anterior cruciate ligament. A potential explanation for female athletic injury. *Am J Sports Med*. 1997 Jan;25(5):704–9.

Maffulli N, Wong J, Almekinders LC. Types and epidemiology of tendinopathy. *Clin Sports Med*. 2003 Oct;22(4):675–92.

Magnusson SP, Hansen M, Langberg H, Miller B, Haraldsson B, Westh EK, et al. The adaptability of tendon to loading differs in men and women. *Int J Exp Pathol*. 2007 Aug;88(4):237–40.

Mann RA. Posterior tibial tendon dysfunction. Treatment by flexor digitorum longus transfer. *Foot Ankle Clin*. 2001;6(1):77–87, vi.

Mann RA. Rupture of the tibialis posterior tendon. *Instr Course Lect*. 1984 Jan;33:302–9.

Michelson J, Easley M, Wigley FM, Hellmann D. Posterior tibial tendon dysfunction in rheumatoid arthritis. *Foot Ankle Int*. 1995 Mar;16(3):156–61.

Miller BF, Hansen M, Olesen JL, Schwarz P, Babraj JA, Smith K, et al. Tendon collagen synthesis at rest and after exercise in women. *J Appl Physiol*. 2007;102(2):541–6.

Mokone GG, Gajjar M, September A V, Schwellnus MP, Greenberg J, Noakes TD, et al. The guanine-thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C gene is associated with achilles tendon injuries. *Am J Sports Med*. 2005;33(7):1016–21.

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

Mosier SM, Pomeroy G, Manoli A. Pathoanatomy and etiology of posterior tibial tendon dysfunction. *Clin Orthop Relat Res*. 1999 Aug;(365):12–22.

Motta G da R, Amaral MV, Rezende E, Pitta R, Vieira TC dos S, Duarte MEL, et al. Evidence of genetic variations associated with rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg.* 2014 Feb;23(2):227-35J.

Myerson M, Solomon G, Shereff M. Posterior tibial tendon dysfunction: its association with seronegative inflammatory disease. *Foot Ankle.* 1989 Apr;9(5):219–25.

Myerson MS. Adult acquired flatfoot deformity: treatment of dysfunction of the posterior tibial tendon. *Instr Course Lect.* 1997 Jan;46:393–405.

Namipashaki A, Razaghi-Moghadam Z, Ansari-Pour N. The essentiality of reporting hardy-weinberg equilibrium calculations in population-based genetic association studies. *Cell J.* 2015;17(2):187–92.

Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol.* 2001 Sep;45(3 Suppl):S116-24.

Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res.* 2000 Jan;2(5):360–6.

Nilsson S, Gustafsson J-Å. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Jan;89(1):44–55.

Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001 Oct;81(4):1535-65.

Nott SL, Huang Y, Fluharty BR, Sokolov AM, Huang M, Cox C, et al. Do Estrogen receptor beta polymorphisms play a role in the pharmacogenetics of estrogen signaling? *Curr Pharmacogenomics Person Med.* 2008 Dec 1;6(4):239–59.

Oliva F, Piccirilli E, Berardi AC, Frizziero A, Tarantino U, Maffulli N. Hormones and tendinopathies: The current evidence. *Br Med Bull.* 2016 Mar;117(1):39–58.

Orr JD, Nunley JA. Isolated spring ligament failure as a cause of adult-acquired flatfoot deformity. *Foot Ankle Int.* 2013 Jun;34(6):818–23.

Osborne BCK, Zhao HH, Fuqua SAW, Osborne CK, Zhao HH, Fuqua SAW, et al. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol.* 2000 Sep;18(17):3172–86.

Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol.* 2005 Mar 10;23(8):1616–22.

Otis JC, Gage T. Function of the posterior tibial tendon muscle. *Foot Ankle Clin.* 2001 Mar;6(1):1–14.

Petersen W, Hohmann G, Stein V, Tillmann B. The blood supply of posterior tibial tendon. *J Bone Jt Surg.* 2002;84(January):2–5.

Posthumus M, September A V., Schwellnus MP, Collins M. Investigation of the Sp1-binding site polymorphism within the COL1A1 gene in participants with Achilles tendon injuries and controls. *J Sci Med Sport.* 2009;12:184–9.

Prado MP, de Carvalho AE, Rodrigues CJ, Fernandes TD, Mendes AAM, Salomao O. Vascular density of the posterior tibial tendon: a cadaver study. *Foot Ankle Int.* 2006;27:628–31.

Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Feb;265–266:138–42.

Pruna R, Artells R, Ribas J, Montoro B, Cos F, Muñoz C, et al. Single nucleotide polymorphisms associated with non-contact soft tissue injuries in elite professional soccer players: influence on degree of injury and recovery time. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013 Jan;14(1):221.

Raleigh SM, van der Merwe L, Ribbans WJ, Smith RKW, Schwellnus MP, Collins M. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. *Br J Sports Med.* 2009 Jul;43(7):514–20.

Riggs BL, Melton LJ. The prevention and treatment of osteoporosis. *N Engl J Med.* 1992 Aug 27;327(9):620–7.

Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology.* 2004;43(2):131–142.

Rugh JT. Three frequent causes of weak and of flat feet. *Ann Surg.* 1921 Apr;73(4):499–503.

Salles JI, Amaral MV, Aguiar DP, Lira DA, Quinelato V, Bonato LL, et al. BMP4 and FGF3 haplotypes increase the risk of tendinopathy in volleyball athletes. *J Sci Med Sport.* 2015 Mar;18(2):150–5.

Sanhudo J, Gomes J. Association between leg length discrepancy and posterior tibial tendon dysfunction. *Foot Ankle Spec.* 2014;7(2):119–26.

Saunders CJ, van der Merwe L, Posthumus M, Cook J, Handley CJ, Collins M, et al. Investigation of variants within the COL27A1 and TNC genes and Achilles tendinopathy in two populations. *J Orthop Res.* 2013 Apr;31(4):632–7.

Savage KJ, Clarkson PM. Oral contraceptive use and exercise-induced muscle damage and recovery. *Contraception.* 2002 Jul;66(1):67–71.

Saxon LK, Turner CH, Frost HM, Frost HM, Frost HM, Lanyon LE, et al. Estrogen receptor beta: the antimechanostat? *Bone.* 2005 Feb;36(2):185–92.

Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha. *J Biol Chem*. 1999 Nov 19;274(47):33551–6.

Schuit SCE, Oei H-HS, Witteman JCM, Geurts van Kessel CH, van Meurs JBJ, Nijhuis RL, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 2004 Jun 23;291(24):2969–77.

September AV, Cook J, Handley CJ, van der Merwe L, Schwellnus MP, Collins M. Variants within the COL5A1 gene are associated with Achilles tendinopathy in two populations. *Br J Sports Med*. 2009;43:357–65.

September A V., Nell E-M, O'Connell K, Cook J, Handley CJ, van der Merwe L, et al. A pathway-based approach investigating the genes encoding interleukin-1, interleukin-6 and the interleukin-1 receptor antagonist provides new insight into the genetic susceptibility of Achilles tendinopathy. *Br J Sports Med*. 2011 May 10;45(13):1040–7.

Shen LX, Basilion JP, Stanton VP, Jr. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 6;96(14):7871–6.

Smith DF, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol*. 1993 Jan;7(1):4–11.

Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett*. 2008 Jan 9;582(1):2–9.

Stavrou I, Zois C, Chatzikyriakidou A, Georgiou I, Tsatsoulis A. Combined estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta genotypes influence the age of menarche. *Hum Reprod*. 2006 Feb;21(2):554–7.

Stein RE. Rupture of the posterior tibial tendon in closed ankle fractures. Possible prognostic value of a medial bone flake: report of two cases. *J Bone Joint Surg Am*. 1985 Mar;67(3):493–4.

Stender JD, Frasor J, Komm B, Chang KCN, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen-regulated gene networks in human breast cancer cells: involvement of E2F1 in the regulation of cell proliferation. *Mol Endocrinol*. 2007 Sep;21(9):2112–23.

Sullivan BE, Carroll CC, Jemiolo B, Trappe SW, Magnusson SP, Døssing S, et al. Effect of acute resistance exercise and sex on human patellar tendon structural and regulatory mRNA expression. *J Appl Physiol*. 2009 Feb;106(2):468–75.

Sundarrajan C, Liao WX, Roy AC, Ng SC. Association between estrogen receptor-beta gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jan 2;86(1):135–9.

Supple KM, Hanft JR, Murphy BJ, Janecki CJ, Kogler GF. Posterior tibial tendon dysfunction. *Semin Arthritis Rheum*. 1992 Oct;22(2):106–13.

Tashjian RZ, Granger EK, Farnham JM, Cannon-Albright LA, Teerlink CC. Genome-wide association study for rotator cuff tears identifies two significant single-nucleotide polymorphisms. *J Shoulder Elb Surg*. 2016 Feb;25(2):174–9.

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.

Tiidus PM, Enns DL. Point:Counterpoint: Estrogen and sex do/do not influence post-exercise indexes of muscle damage, inflammation, and repair. *J Appl Physiol*. 2009 Mar;106(3):1010-2-15, 1021.

Torricelli P, Veronesi F, Pagani S, Maffulli N, Masiero S, Frizziero A, et al. In vitro tenocyte metabolism in aging and oestrogen deficiency. *Age (Omaha)*. 2013 Dec;35(6):2125–36.

Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000 Jun;18(1):6–9.

Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev*. 1994 Jun;15(3):275–300.

Vailas AC, Tipton CM, Laughlin HL, Tcheng TK, Matthes RD. Physical activity and hypophysectomy on the aerobic capacity of ligaments and tendons. *J Appl Physiol*. 1978 Apr;44(4):542–6.

Van Boerum DH, Sangeorzan BJ. Biomechanics and pathophysiology of flat foot. *Foot Ankle Clin*. 2003 Sep;8(3):419-30.

Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med*. 2000 Feb;108(2):153–64.

Welboren W-J, Sweep FCGJ, Span PN, Stunnenberg HG. Genomic actions of estrogen receptor alpha: what are the targets and how are they regulated? *Endocr Relat Cancer*. 2009 Dec;16(4):1073–89.

Xu Y, Murrell G a C. The basic science of tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res*. 2008;466(November 2007):1528–38.

Yu WD, Panossian V, Hatch JD, Liu SH, Finerman GA. Combined effects of estrogen and progesterone on the anterior cruciate ligament. *Clin Orthop Relat Res*. 2001 Feb;(383):268–81.

Zgonis T. Adult-acquired flatfoot deformity. *Clin Podiatr Med Surg*. 2014;31(7):399–406.

Zhang W, Yu YY. Polymorphisms of short tandem repeat of genes and breast cancer susceptibility. *Eur J Surg Oncol.* 2007 Jun;33(5):529–34.