

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Lucas Rafael Lopes

Polimorfismos em genes envolvidos com a atividade das células T regulatórias e a expressão do fator de necrose tumoral tipo alfa no desenvolvimento da tendinopatia

Rio de Janeiro

2020

Lucas Rafael Lopes

Polimorfismos em genes envolvidos com a atividade das células T regulatórias e a expressão do fator de necrose tumoral tipo alfa no desenvolvimento da tendinopatia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientadora: Dra. Jamila Alessandra Perini

Coorientador: Dr. Daniel Escorsim Machado

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

L864p Lopes, Lucas Rafael.
Polimorfismos em genes envolvidos com a atividade das células T regulatórias e a expressão do fator de necrose tumoral tipo alfa no desenvolvimento da tendinopatia / Lucas Rafael Lopes. -- 2020.
115 f. : il. color. ; graf. ; tab.

Orientadora: Jamila Alessandra Perini.

Coorientador: Daniel Escorsim Machado.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2020.

1. Tendinopatia. 2. Polimorfismo Genético. 3. Fator de Necrose Tumoral alfa. 4. Linfócitos T Reguladores. 5. Estudos de Casos e Controles. I. Título.

CDD – 23.ed. – 616.75

Lucas Rafael Lopes

Polimorfismos em genes envolvidos com a atividade das células T regulatórias e a expressão do fator de necrose tumoral tipo alfa no desenvolvimento da tendinopatia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 12/03/2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Wagner Santos Coelho
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Prof. Dr. Enrico Mendes Saggioro
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Daniel Escorsim Machado (Coorientador)
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Prof.^a Dra. Jamila Alessandra Perini (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Rio de Janeiro

2020

Dedico este estudo a senhora D. Nilza, minha mãe (i.m.).

AGRADECIMENTOS

Durante a trajetória do mestrado e concretização dessa dissertação, várias pessoas se fizeram presentes colaborando com experimentos, palavras, atitudes e afetos. No entanto, minha gratidão a elas vai além das palavras-chave usadas para uma revisão sistemática ou do nível de significância interpretado por uma análise multivariada.

Primeiramente, agradeço à Deus por se fazer presente em todos os momentos, me mostrando que seus planos são bem maiores que os meus. À minha família que é o alicerce dessa trajetória, em especial as minhas irmãs, Adriana e Fernanda, por me proporcionarem amor, amizade e cumplicidade todos os dias. E claro, a minha grande inspiração (minha mãe), que mesmo quando a saudade fala mais alto, se faz presente como o vento: não a vejo, mas a sinto.

Agradeço ao meu companheiro Armando, que em meio a tantos estudos, coletas, análises, provas, disciplinas e escrita, sempre esteve ao meu lado, seja escutando minhas alegrias ou frustrações. Também, aos meus grandes e queridos amigos, tanto de perto quanto de longe, por sempre me ensinarem qual o grande sentido da vida.

Agradeço ainda, aos professores da ENSP que contribuíram muito para minha formação durante o mestrado. Aos alunos de iniciação científica do INTO, que sempre me ajudaram nas coletas, experimentos e conferência de dados, sendo essenciais para o resultado final deste trabalho. E também, a família LaPesF e LaPAC, na qual cada um com sua contribuição particular, me ensinam a cada dia mais que o verdadeiro significado do trabalho em equipe é unificar a dificuldade de um, tornando a humildade como recompensa de todos.

Ao professor Daniel Machado por ser a base do laboratório, colaborando com seu aprendizado científico em todos os projetos de pesquisa. Em especial, pela sua grande contribuição na concretização deste trabalho, seja com discussão científica sobre o tema, ou pelos conselhos profissionais e pessoais que me incentivam e encorajam seguir a carreira acadêmica.

E por fim, o meu muito obrigado à minha orientadora, professora, conselheira e amiga Jamila Perini, por cada oportunidade oferecida, pelo colo materno de cada dia, pelos detalhes nos ensinamentos e por sempre acreditar no rumo dessa trajetória. Ainda temos mais quatro anos pela frente, mas saiba que sempre serei grato por me fazer acreditar que “se podemos sonhar, também podemos tornar nossos sonhos realidade”.

Apenas os ombros mais fortes podem carregar a esperança de uma nação.

TAYLOR, 2018.

RESUMO

A tendinopatia é uma doença degenerativa do tendão, causada por altos níveis de estresse mecânico ou acúmulo de microtraumas, que provocam a desorganização do tecido tendíneo. É uma doença multifatorial, que acomete 2 - 9% da população em geral, muito frequente em indivíduos que trabalham em ambientes suscetíveis a riscos ergonômicos, sendo considerada um distúrbio osteomuscular relacionado ao trabalho (Dort). Em atletas profissionais, que são altamente expostos a movimentos contínuos, a tendinopatia pode ocorrer em até 50% dos indivíduos. A principal queixa dos pacientes é a dor crônica no tendão afetado, que é resultado dos processos inflamatórios nas fases iniciais do desenvolvimento da lesão. Estudos indicam que as células T regulatórias (Treg), influenciadas pela proteína *forkhead-box* tipo3 (FOXP3) e pelo fator de transcrição homólogo aos receptores FcγIII clássicos (FcRL3), modulam a resposta imunológica para reparar a lesão no tendão. Além disso, uma maior expressão gênica do fator de necrose tumoral tipo alfa (*TNF-α*) também é encontrada em tendões degenerados. Sendo assim, este trabalho teve por finalidade avaliar a influência de polimorfismos dos genes *FcRL3*, *FOXP3* e *TNF-α* no desenvolvimento da tendinopatia. Trata-se de um estudo analítico de caso-controle envolvendo 270 atletas brasileiros, sendo divididos em casos diagnosticados de tendinopatia e controles. Os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) *FcRL3* -169T>C, *FOXP3* -2383C>T e *TNF-α* (-1031 T>C, -857C>T, -308G>A) foram determinados pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR), utilizando sistema TaqMan. As razões de chances brutas e ajustadas (OR) com os seus intervalos de confiança (IC) de 95% foram estimadas usando o método de regressão logística multivariada não-condicional. A idade ($P < 0,001$), o sexo ($P < 0,001$), o índice de massa corporal ($P = 0,04$), o acompanhamento nutricional ($P = 0,001$), o tempo de prática no esporte ($P = 0,001$) e a presença de dor no tendão ($P < 0,001$) foram identificados como fatores de risco para a tendinopatia em atletas. O genótipo e o alelo variante do polimorfismo *FcRL3* -169T>C (OR: 2,02, IC 95%: 1,00 - 4,09 e OR: 1,44, IC 95%: 1,02 - 2,04, respectivamente) e o haplótipo *TNF-α* TCA (-1031 T>C, -857C>T, -308G>A) (OR: 2,65, IC 95%: 1,32 - 5,30) foram associados positivamente com o desenvolvimento da tendinopatia em atletas. Estes resultados evidenciam que polimorfismos dos genes envolvidos com a atividade das células Treg e a expressão de *TNF-α* estão associados com a suscetibilidade da tendinopatia e podem contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos ou programas de prevenção da doença.

Palavras-chave: Tendinopatia. Polimorfismos genéticos. *TNF-α*. Células T regulatórias.

ABSTRACT

Tendinopathy is a degenerative disease of the tendon, caused by high levels of mechanical stress or accumulation of microtraumas that cause disorganization of the tendon tissue. It is a multifactorial disease, which affects 2 - 9% of the general population, being frequent in individuals who work in environments susceptible to ergonomic risks, being considered a work-related musculoskeletal disorder (Dort). In professional athletes, who are highly exposed to overuse movements, tendinopathy can occur in up to 50% of individuals. The main complaint of patients with the lesion is chronic pain in the affected tendon, which is the result of inflammatory processes in the early stages of lesion development. Studies shown that regulatory T cells (Treg), influenced by the type 3 forkhead-box protein (FOXP3) and by the transcription factor homologous to classic FcγIII receptors (FcRL3), modulate the immune response to repair a tendon injury. Moreover, the high gene expression of tumor necrosis factor type alpha (*TNF-α*) is found in degenerated tendons. Thus, this study aimed to evaluate the influence of polymorphisms of the *FcRL3*, *FOXP3* and *TNF-α* genes in the development of tendinopathy. This is an analytical case-control study involving 270 Brazilian athletes, divided into diagnosed cases of tendinopathy and controls. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) *FcRL3* -169T>C, *FOXP3* -2383C>T and *TNF-α* (-1031 T>C, -857C>T, -308G>A) were determined by the polymerase chain reaction in time (PCR), using the TaqMan system. The odds ratios (OR) with their 95% confidence intervals (CI) were estimated using the non-conditional multivariate logistic regression method. The age ($P<0.001$), sex ($P<0.001$), body mass index ($P=0.04$), nutritional monitoring ($P=0.001$) and practice time in sport ($P=0.001$) and the presence of tendon pain ($P<0.001$) were identified as risk factors for tendinopathy in athletes. The variant genotype and allele of the *FcRL3* -169T>C polymorphism (OR: 2.02, 95% CI: 1.00-4.09 and OR: 1.44, 95% CI: 1.02-2.04, respectively) and the *TNF-α* TCA (-1031 T>C, -857C>T, -308G>A) haplotype (OR: 2.65, 95% CI: 1.32-5.30) were positively associated with development tendinopathy in athletes. These results show that polymorphisms of the genes involved with the activity of Treg cells and the expression of *TNF-α* are associated with the susceptibility of tendinopathy and may contribute to the identification of new therapeutic targets or programs for disease prevention.

Keywords: Tendinopathy. Genetics polymorphisms. *TNF-α*. Regulatory T cell.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura e organização em níveis hierarquizados de um tendão.....	17
Figura 2 -	Histologia da tendinopatia corada com Hematoxilina e Eosina.....	18
Figura 3 -	Diagnóstico por imagem da tendinopatia patelar.....	24
Figura 4 -	Imunobiologia da tendinopatia.....	26
Figura 5 -	Regulação de FOXP3 nas células T regulatórias.....	29
Figura 6 -	Estrutura do gene <i>FOXP3</i> e a localização do SNP <i>-2383C>T</i> (rs3761549).....	29
Figura 7 -	Estrutura do gene <i>FcRL3</i> e a localização do SNP <i>-169 T>C</i> (rs7528684).....	30
Figura 8 -	Representação esquemática do gene do fator de necrose tumoral tipo α (<i>TNF-α</i>).....	33
Figura 9 -	População de estudo recrutada para análise dos polimorfismos <i>FOXP3 -2383C>T</i> e <i>FcRL3 -169T>C</i>	29
Figura 10 -	Pareamento da população de estudo para análise dos polimorfismos <i>TNF-α (-1031T>C, -857C>T, -308G>A)</i>	40
Figura 11 -	Descrição do sistema Taqman.....	43
Figura 12 -	Exemplo de discriminação genotípica obtida por PCR em tempo real.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Varição da frequência (%) do menor alelo dos SNPs <i>FOXP3</i> -2383C>T e <i>FcRL3</i> – 169T>C em diferentes populações saudáveis estudadas.....	31
Tabela 2 -	Varição da frequência (%) do menor alelo dos SNPs <i>TNF-α</i> (-1031 T>C, -857C>T, -308G>A) em diferentes populações saudáveis estudadas.....	34
Tabela 3 -	Ensaio TaqMan (sandas e oligonucleotídeos) para genotipagens dos SNPs estudados dos genes <i>FOXP3</i> , <i>FcRL3</i> e <i>TNF-α</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP1	Proteína ativadora 1
CBV	Confederação Brasileira de Voleibol
CD25	Receptor de IL-2
CT	Centro de Treinamento
DAMP	Padrão Molecular Associado a Dano
DEFB1	Gene da Proteína beta-defensina 1
DORT	Distúrbio Osteomuscular Relacionado ao Trabalho
ESRRB	Gene do Receptor beta relacionado ao estrogênio
FcRL3	Fator de transcrição homólogo aos receptores Fc γ III clássicos
FGF10	Gene do Fator de crescimento fibroblástico 10
FGFR1	Gene do Receptor 1 do fator de crescimento fibroblástico
FOXP3	Forkhead-box tipo3
HLA-DR	Gene HLA tipo DR
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de Confiança
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
KDR	Receptor Domínio Kinase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMP-1	Metaloproteinase de matriz 1
MMP-3	Metaloproteinase de matriz 3
NFAT	Células T ativadas
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B
OR	<i>Odds ratio</i> (Razão de chance)
oxLDL	Forma oxidada do LDL
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGE ₂	Prostaglandina E2
PRP	Plasma rico em plaquetas
RM	Ressonância Magnética

SAP30BP	Gene da proteína de ligação SAP30
SASH1	Gene da proteína 1 contendo domínio SAM e SH3
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SUS	Serviço Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Fator de necrose tumoral tipo alfa
Treg	Linfócitos T regulatórios
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR2	Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VISA	Victorian Institute of Sport Assessment
χ^2	Teste de Chi-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	ESTRUTURA E FISIOLOGIA DO TENDÃO.....	16
2.2	TENDINOPATIA.....	17
2.2.1	Epidemiologia da Tendinopatia	18
2.2.2	Impacto da tendinopatia na saúde pública	19
2.2.3	Fatores de risco associados a tendinopatia	20
2.2.4	Sintomas da tendinopatia	21
2.2.5	Diagnóstico da tendinopatia	22
2.2.6	Tratamento da tendinopatia	24
2.2.7	Fisiopatologia da tendinopatia	25
2.3	TENDINOPATIA E GENÉTICA.....	27
2.4	GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DA TENDINOPATIA E SEUS POLIMORFISMOS.....	28
2.4.1	Papel de genes moduladores das células T regulatórias	28
2.4.2	Papel do gene <i>TNF-α</i>	31
3	JUSTIFICATIVA	35
4	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVO GERAL.....	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5	METODOLOGIA	37
5.1	DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	37
5.2	SELEÇÃO DE CASOS E CONTROLES.....	38
5.2.1	Seleção de atletas para análise dos polimorfismos <i>FOXP3 -2383C>T</i> e <i>FcRL3 -169T>C</i>	38
5.2.2	Seleção de atletas para análise dos polimorfismos <i>TNF-α (-308G>A, - 857C>T, -1031 T>C)</i>	39
5.3	COLETA DE DADOS.....	40
5.4	COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	41
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5.6	ASPECTOS ÉTICOS.....	45
6	RESULTADOS	46

6.1	POLIMORFISMO <i>FC RECEPTOR-LIKE 3 (-169T>C)</i> AUMENTA O RISCO DA TENDINOPATIA EM ATLETAS DE VOLEIBOL: UM ESTUDO DE CASO – CONTROLE.....	46
6.2	POLIMORFISMOS DO GENE <i>FATOR DE NECROSE TUMORAL TIPO ALFA (TNF-α)</i> AUMENTAM O RISCO DE TENDINOPATIA EM ATLETAS: UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE.....	58
7	DISCUSSÃO	79
8	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	84
	ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	96
	ANEXO B – ESTUDO TRANSVERSAL - QUESTIONÁRIO VALIDADO POR ESPECIALISTAS	101
	ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	114

1 INTRODUÇÃO

A tendinopatia é uma doença degenerativa que ocorre quando os tendões são submetidos a altos níveis de estresse mecânico e/ou pelo acúmulo de microtraumas e distribuição irregular de sua carga tênsil (WU et al., 2011). É um distúrbio com causa desconhecida, no entanto pode se desenvolver em indivíduos que trabalham em ambientes suscetíveis a riscos ergonômicos, causando um alto impacto social e econômico devido à perda de produtividade e compensação por doença, custos para a administração de saúde pública e suplementar com diagnósticos e tratamentos, e por vezes na aposentadoria precoce por invalidez devido as limitações físicas e psicossociais dos trabalhadores, o que torna a doença como um grave problema de saúde ocupacional do mundo (HOPKINS et al., 2016, FEARON et al., 2014, BRASIL, 2012).

A prevalência da tendinopatia varia conforme o tendão afetado por meio dos movimentos incessantes realizados pelos indivíduos. Na população em geral, é mais frequente nos indivíduos que trabalham em ambientes suscetíveis a riscos ergonômicos, sendo considerada um distúrbio osteomuscular relacionado ao trabalho (Dort), assim a tendinopatia patelar (8,5%), tendinopatia de Aquiles (3,8 – 5,6%), epicondilite (0,3 – 6,6%) e tendinopatia no manguito rotador (2 – 3,8%) são os quatro tipos mais prevalentes (HOPKINS et al., 2016). No entanto, em atletas profissionais, a prevalência da tendinopatia é mais elevada (10 - 50%), devido a estarem altamente expostos a uma intenso volume de atividades físicas que aumentam a sobrecarga mecânica absorvida pelo tendão (ABAT et al., 2017, HOPKINS et al., 2016, KUJALA et al., 2005).

O cenário clínico da tendinopatia é bastante uniforme para todos os locais da morbidade, no qual a dor à palpação no tendão lesionado, inchaço e redução da amplitude articular do movimento são os achados clínicos mais consistente encontrados (MORTON et al., 2015). Porém, a complexidade da doença envolvida por fatores modificáveis e não-modificáveis contribuem para uma predisposição ou indício de suscetibilidade à lesão, dificultando assim o diagnóstico precoce para evitar sua progressão patológica (MORTON et al., 2015, RIBBANS; COLLINS, 2013).

O estágio inicial da tendinopatia apresenta um perfil inflamatório, devido a um influxo de células imunológicas e a produção de citocinas que interagem com os tenócitos para tentar reparar a lesão tecidual (MILLAR et al., 2017, MARSOLAIS et al., 2001). As células T regulatórias CD4⁺ CD25⁺ (Treg) são supressoras da atividade imunológica, sendo capazes de favorecer a regeneração do tendão lesionado. Contudo, a efetividade de sua

função é regulada positivamente pela proteína *forkhead-box P3* (FOXP3) e inversamente pelo fator de transcrição homólogo aos receptores FcγIII clássicos (FcRL3) (BAJPAI et al., 2012). Além disso, citocinas pró-inflamatórias podem retardar o processo de reparo pós-lesão, como o caso do fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- α), que induz o processo de apoptose dos tenócitos, favorecendo a degeneração primária do tendão (DOCHEVA et al. 2015, FONT TELLADO et al. 2015, FUCHS; STELLER, 2015).

Apesar da etiologia da tendinopatia não ser totalmente esclarecida, a suscetibilidade genética pode contribuir para o fenótipo desta doença (MAFFULLI et al., 2013). Desse modo, nosso grupo vem se dedicando na identificação de polimorfismos genéticos que possam estar associados com o desenvolvimento da doença. Recentemente, foi avaliada a influência de polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) dos genes do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) e seu receptor tipo 2 (VEGFR2), codificado pelo gene receptor domínio kinase (*KDR*), envolvidos na angiogênese, processo importante para a estrutura fisiológica e tensão mecânica do tendão. Foi observada associação negativa do SNP *KDR 1192G>A* com o desenvolvimento da tendinopatia (OR: 0,41; IC95%: 0,19 - 0,88) em atletas de voleibol (SALLES et al., 2016).

Nesse contexto, torna-se relevante estudar os mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia imunológica da tendinopatia, com o intuito de identificar os fatores associados com o desenvolvimento da doença.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESTRUTURA E FISIOLOGIA DO TENDÃO

Os tendões são estruturas que ligam os músculos esqueléticos aos ossos ou a outros músculos, permitindo assim o movimento das articulações ou a manutenção da postura do corpo, além de transmitir força e absorver impactos biomecânicos (TADROS et al., 2018, XU; MURREL, 2008, WANG, 2006). São formados por tecido conjuntivo denso modelado, sendo compostos por células (20%) e matriz extracelular (80%) (LONGO et al., 2018).

O material celular é composto por tenoblastos e tenócitos, que correspondem a cerca de 90-95% de todo conteúdo celular no tecido (LONGO et al., 2018). Os tenoblastos são células tendíneas imaturas que possuem alta atividade metabólica por consumo de oxigênio, sendo assim responsáveis pela produção da matriz extracelular organizada do tecido, devido a sintetizarem colágenos, fibronectina e proteoglicanos (HOPE; SAXBY, 2007). Os tenócitos são células provenientes da maturação dos tenoblastos, responsáveis por secretar colágenos e suportar cargas ou tensões biomecânicas por grandes períodos de tempo (LONGO et al., 2018).

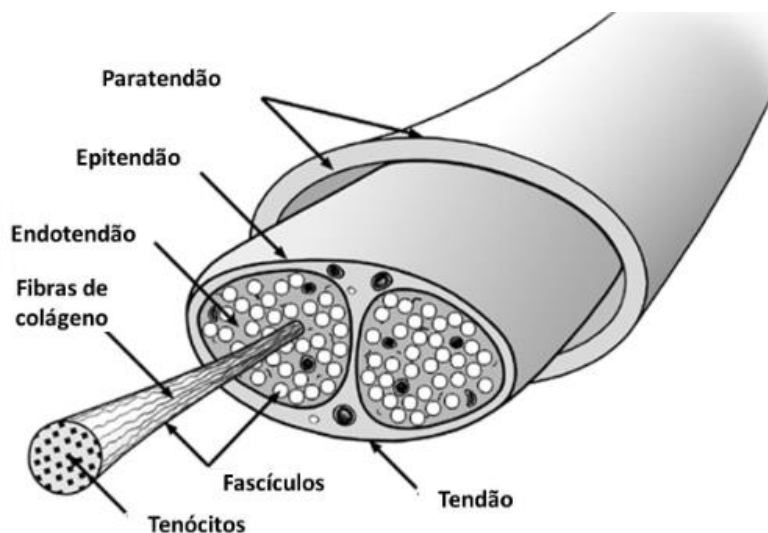
A matriz extracelular dos tendões é altamente sensível às ações celulares, as quais remodelam seu desenvolvimento, homeostase e regeneração tecidual, por meio de digestão enzimática e deposição de matriz recém-sintetizada. Esse processo, além de prover ancoragem e arcabouço mecânico para a renovação tecidual, tem um importante papel na regulação da morfologia, diferenciação, migração e metabolismo celulares dos tendões (WU et al., 2011). O principal elemento da matriz é o colágeno, essencial para o tendão pois provê integridade estrutural, contribui para a força mecânica do tecido e constitui cerca de 60% de seu peso seco. O tipo predominante é o colágeno tipo I, que responde por aproximadamente 95% da quantidade total de colágeno, sendo responsável pela densidade do tecido (SHARMA; MAFFULLI, 2006; TAYLOR et al., 2009). Ainda, há presença do colágeno tipo V, que é intercalado com um núcleo de fibrilas de colágeno tipo I, regulando o crescimento fibrilar e do colágeno tipo III, que sob a forma de pequenas fibras reticulares desorganizadas, podem ocasionar redução da força mecânica (COLLINS, 2010, WANG, 2006).

Estruturalmente, o tendão é organizado em níveis hierarquizados (figura 1), no qual o primeiro nível é formado pela agregação das fibras de colágeno que se dispõem

paralelamente em torno do endotendão, formando os fascículos. Os fascículos, por sua vez, são circundados pelo epitendão que contém os sistemas vasculares, linfáticos e nervos, caracterizando o segundo nível hierárquico. Por fim, o tendão é envolvido pelo paratendão que possui uma camada interna de líquido sinovial e evita a fricção contra tecidos circundantes, formando o terceiro nível hierárquico (FESSEL, 2009, WANG, 2006).

Essa composição favorece ao aumento da força tendínea, além de assegurar o não espalhamento lesivo ao longo do tecido. A origem da força tendínea reside na organização das fibras de colágeno em feixes paralelos, que distribui as cargas e evita os danos causados pela concentração de estresse em um único ponto do tecido (WANG, 2006, FESSEL, 2009).

Figura 1 - Estrutura e organização em níveis hierarquizados de um tendão



Fonte: Adaptado de www.msdlatinamerica.com. Acesso em 20 de dezembro de 2019.
Relação entre as fibras de colágeno, fascículos, unidades de tendão e os tecidos conjuntivo que os circundam respectivamente.

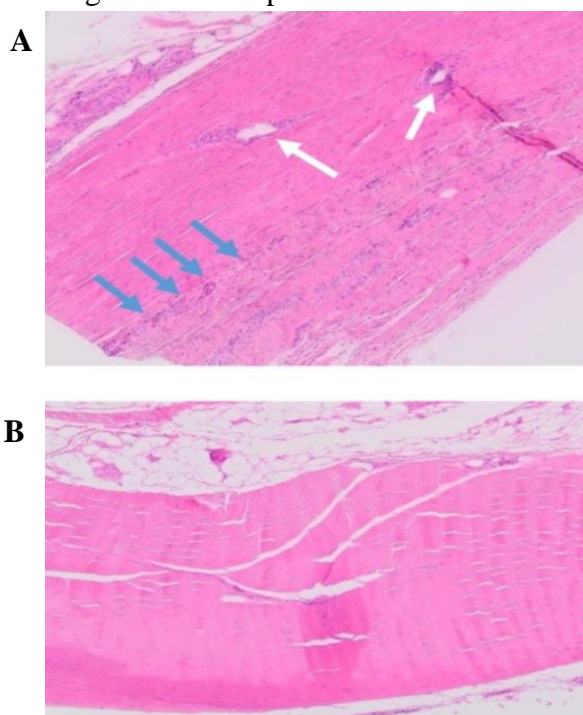
As cargas mecânicas desempenham um importante papel na organização tecidual e também na fisiologia do tendão, pois modificam a estrutura, composição e propriedades mecânicas do tendão (SAKABE; SAKAI, 2011, KOVACEVIC; RODEO, 2008). No entanto, quando as cargas são intensas, ocorrem microrupturas que levam um aumento no processo inflamatório local, provocando a tendinopatia (SHARMA; MAFFULLI, 2006).

2.2 TENDINOPATIA

A tendinopatia é uma doença degenerativa do tendão, causada por altos níveis de

estresse mecânico ou acúmulo de microtraumas que provocam a alteração das fibras colágenas, além do aumento da permeabilidade vascular, promovendo a desorganização do tecido tendíneo (TADROS et al., 2018, WU et al., 2011). As alterações morfológicas promovem um afrouxamento do tecido, tornando o tendão mais suscetível a ruptura, provocando dor (HOPE; SAXBY, 2007). Macroscopicamente, a tendinopatia se apresenta como uma degeneração mucoide e de cor acastanhada (GONÇALVES-NETO et al., 2002). Histologicamente, como ilustrado na figura 2A, confirma-se que o tendão apresenta desorganização e micro ruptura das fibras de colágeno e hiper celularidade arredondada (SATOMI et al., 2008). Na figura 2B, encontra-se a histologia de um tendão normal que apresenta boa organização estrutural das fibrilas de colágenos, com padrão de bandas típicas e presença de células fusiformes.

Figura 2 - Histologia da tendinopatia corada com Hematoxilina e Eosina



Fonte: Adaptado de Calder et al. (2016). (A) Aumento da celularidade arredondada (flechas azuis) e microrupturas de fibras com canal mucóide (setas brancas) consistentes com tendinopatia. (B) Tecido com fibrilas de colágeno organizadas e alinhadas, característico de um tendão normal (Fotos com ampliação $\times 10$).

2.2.1 Epidemiologia da Tendinopatia

A tendinopatia é um problema clínico comum em indivíduos que trabalham em ambientes suscetíveis a riscos ergonômicos, sendo considerado um Dort, comum em atletas profissionais (ABAT et al., 2017, MAFFULLI et al. 2003, MINISTÉRIO DA

PREVIDÊNCIA E ASSISTÊNCIA SOCIAL, 1987).

Os distúrbios causados no tendão devido a trabalhos com esforços repetitivos não são recentes, porém representam na atualidade um grave problema socioeconômico e de saúde pública no Brasil, em razão da extensa população exposta a riscos ergonômicos (MEDINA; MAIA, 2016). Ocorre em trabalhadores de indústrias de eletrodomésticos, medicamentos, carros, construção, processamento de alimentos, dentistas, escritórios, bancos, manufatura de equipamentos, carregadores, terminais de vídeo, operadores de máquina, telefonistas, digitadores, empacotadores, vendedores, perfuradores, calculadores, entre outros (MAULIK et al., 2014, OZDOLAP et al., 2013; ALEXANDRE et al., 2011, McCORMACK, 2010, LEITE et al., 2007, SAKATA; ISSY, 2003).

Na população em geral, a tendinopatia patelar no joelho (8,5%), tendinopatia de Aquiles no calcanhar (3,8 – 5,6%), epicondilite no cotovelo (0,3 – 6,6%) e tendinopatia no manguito rotador do ombro (2 – 3,8%) são os quatro tipos mais prevalentes da lesão (HOPKINS et al., 2016). No entanto, devido a extensa carga mecânica exercida sobre os tendões diariamente, a prevalência da tendinopatia em atletas varia entre 10-50%, dependendo da modalidade esportiva (ABAT et al., 2017, HOPKINS et al., 2016, KUJALA et al., 2005).

Hopkins e cols. (2016) verificaram que a prevalência da tendinopatia em atletas varia de acordo com o tendão afetado, modalidade esportiva, grau de intensidade de treinamento e nível competitivo do atleta. A tendinopatia patelar apresenta-se comumente (15 – 45%) em atletas que praticam esportes de salto (SALLES et al., 2016; LIAN et al., 2005). A tendinopatia de Aquiles é mais frequente em corredores (30%), enquanto que a tendinopatia do manguito rotador e epicondilite acometem mais (20 – 40% e 10 – 30%, respectivamente) os atletas que praticam esportes de lançamento (HOPKINS et al., 2016).

2.2.2 Impacto da tendinopatia na saúde pública

A tendinopatia tem um impacto socioeconômico significativo no âmbito da saúde pública, devido ao número de indivíduos acometidos, complexidade da doença, custo-eficácia de diagnóstico e tratamento, além das implicações econômicas devido a incapacidade para o trabalho (HOPKINS et al., 2016). A perda de produtividade e dias de trabalho, devido ao progresso da lesão, geram efeitos sobre a qualidade de vida dos pacientes e custos com pagamentos de benefícios previdenciários (MORAES et al., 2017).

O aumento da prevalência da lesão na população em geral é resultado das

transformações nas organizações trabalhistas das empresas, que tem se caracterizado pelo estabelecimento de metas e produtividade. Visto que consideram apenas a qualidade dos produtos/serviços e aumento da competitividade de mercado, sem levar em conta as limitações físicas e psicossociais dos trabalhadores. Assim, torna-se um dos maiores problemas de saúde ocupacional do mundo (BRASIL, 2012).

No Brasil, a Política de Saúde do Trabalhador vem sendo desenvolvida desde a Constituição Federal de 1988, e as notificações da tendinopatia relacionadas a saúde ocupacional foram iniciadas no Sistema Único de Saúde (SUS) em 2006. No entanto, os números referentes aos registros no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), em todo o país, não estão equivalentes aos dados da Previdência Social. Isso pode ser devido os dados reportados serem apenas de trabalhadores registrados em carteira, o que não corresponde ao total de trabalhadores que exercem movimentos repetitivos em seus processos ocupacionais (MEDINA; MAIA, 2016).

Em atletas profissionais, a tendinopatia representa uma condição generalizada que podem sofrer maiores perdas econômicas por lesão, atingindo altos custos e perda de produtividade por desempenho. O ônus imposto às atividades diárias não pode ser ignorado, pois cerca de um quarto dos pacientes com epicondilite apresentam dificuldades em vestir-se, carregar objetos, dirigir e dormir (HOPKINS et al., 2016). Além disso, no Brasil há programas de incentivo a atletas, como em caso de bolsa-auxílio e moradia, porém não abrangem condições de saúde. Assim, em casos de lesões graves, o atleta tem que recorrer ao SUS para tratamento, o que aumenta o tempo de afastamento das atividades esportivas, ocasionando perda de contratos com equipes ou até mesmo encerramento precoce da carreira.

2.2.3 Fatores de risco associados a tendinopatia

A tendinopatia é uma doença multifatorial, constituída de fatores intrínsecos e/ou extrínsecos. Os fatores intrínsecos estão associados com a função exercida, idade, força muscular, flexibilidade, irrigação peculiar, atrito e compressões contra estruturas adjacentes e com o trajeto anatômico e suas alterações, sendo que cada um destes fatores pode ter a presença de um componente genético (XU; MURRELL, 2008; RIBBANS; COLLINS, 2013). Já os fatores extrínsecos estão associados às doenças endócrinas metabólicas (obesidade, diabetes mellitus, hipertensão arterial, aumento dos lipídeos séricos, hiperuricemia), doenças sistêmicas, tabagismo, erros no treinamento, influência

hormonal, utilização de antibióticos, fatores ocupacionais, ergonômicos, ambientais, psicológicos e principalmente ao excesso de atividades esportivas (RIBBANS; COLLINS, 2013; XU; MURRELL, 2008; BRASIL, 2012).

Em indivíduos expostos a riscos ergonômicos, o processo de trabalho, incluindo ciclos de trabalhos pequenos, treinamentos inapropriados, atividades contínuas, equipamentos sem manutenção preventiva e ambiente ocupacional desfavorável contribuem para a desregulação de carga estática e dinâmica no tendão (TADROS et al., 2018, BEAULIEU-JONES et al, 2017, MAULIK et al., 2014, MEDINA; MAIA, 2016). Entretanto, o alto estresse exercido sobre os tendões em atletas já foram associados a modalidade esportiva, carga de treinamento realizado por semana, tempo de prática e ambiente físico esportivo (GOUTTEBARGE et al., 2018, MORGAN et al., 2016, OCHARD et al., 2013, WALDEN et al., 2013).

Outros fatores ambientais apontados no surgimento da lesão em atletas, porém ainda pouco discutido, são a diferença de altitude, condições climáticas e fuso horário que os atletas estão submetidos em competições internacionais (OCHARD et al., 2013). A condição ambiental, que o atleta realiza seu treinamento diário, pode ser bem diferente do local que ele irá competir, e desse modo, conseqüentemente, acaba fadigando a resistência normal que o tendão consegue suportar, levando-o ao desenvolvimento da lesão (WALDEN et al, 2013).

Embora estes fatores de riscos extrínsecos estejam associados com a tendinopatia, ainda não há entendimento concreto sobre o desenvolvimento da lesão, uma vez que em fases iniciais os sintomas apresentam-se dubitáveis (ABATE et al., 2009). Dessa forma, estudos da influência de componentes genéticos vêm sendo de fundamental importância para esclarecer e detalhar a complexidade dos fatores envolvidos com a doença.

2.2.4 Sintomas da tendinopatia

O cenário clínico é bastante uniforme para todos os tipos de tendinopatia quando estão em estágios mais avançados. Os pacientes queixam-se de dor no local do tendão afetado, que às vezes surge insidiosamente durante uma sessão de treinamento intenso ou de um movimento atlético específico, e pode diminuir completamente durante o exercício (ABATE et al., 2009).

Hubbard et al. (2018) em sua revisão sistemática sobre a dor provocada por lesões musculoesqueléticas, apresenta estudos que verificaram o local específico da dor para cada

quadro de tendinopatia. Em casos de tendinopatia no manguito rotador, a dor ocorre na região pósterolateral do ombro e no deltoide, e é exacerbada pela abdução do braço acima de 90 graus (HERMANS et al., 2013). Na tendinopatia bicipital, a dor se manifesta no ombro anterior que muitas vezes irradia para o músculo bíceps ou em direção ao deltoide. Essa dor pode piorar à noite ou ser exacerbada pelas atividades de puxar ou levantar (McFARLANDS; BORADE, 2016). A dor da tendinopatia no cotovelo lateral ou medial, também conhecida como epicondilite, se concentra antes do epicôndilo que pode irradiar ao longo dos músculos afetados (SAHRMANN, 2011). Para a tendinopatia de Aquiles, a dor se concentra difusamente no tendão de Aquiles, também conhecido como calcâneo. Além disso, é possível verificar um inchaço ou declínio do tendão durante a movimentação do mesmo (SAINI et al., 2015).

A dor característica da tendinopatia patelar se concentra na região anterior do joelho, devido à alta atividade entre o polo distal da patela e a extremidade proximal do tendão patelar (KHAN et al., 2002). A dor é insidiosa e começa inicialmente depois de atividade física, mas pode progredir para um ponto em que está presente durante qualquer atividade ou é contínua, existente mesmo em repouso (FIGUEROA et al., 2016).

Apesar de locais específicos para cada lesão, com o tempo e a atividade continuada, a dor pode piorar e limitar o desempenho desportivo. Em casos extremos, quando já há ruptura tendínea, a dor é mais intensa durante atividades leves e pode até mesmo aparecer com o paciente em repouso. Além disso, outra queixa comum, é a sensação de rigidez na parte da manhã ou após o repouso (CHRISTOFORETTI; CARROL, 2005; ABATE et al., 2009).

Os tendões também podem ser submetidos a rupturas súbitas após um único estímulo de atividade intensa, que caracteriza a doença como aguda e a torna assintomática (ABATE et al., 2009). Contudo, os sintomas da tendinopatia são fatores importantes que podem comprometer a qualidade de vida do indivíduo e levá-lo ao afastamento de seus trabalhos, principalmente porque não há um diagnóstico precoce para evitar o progresso da doença (HUBBARD et al., 2018, MORTON et al., 2015, ABATE et al., 2009, CHRISTOFORETTI; CARROL, 2005).

2.2.5 Diagnóstico da tendinopatia

O achado clínico mais consistente é a dor à palpação no tendão lesionado, inchaço e redução da amplitude articular do movimento, que são sinais de inflamação (HUBBARD

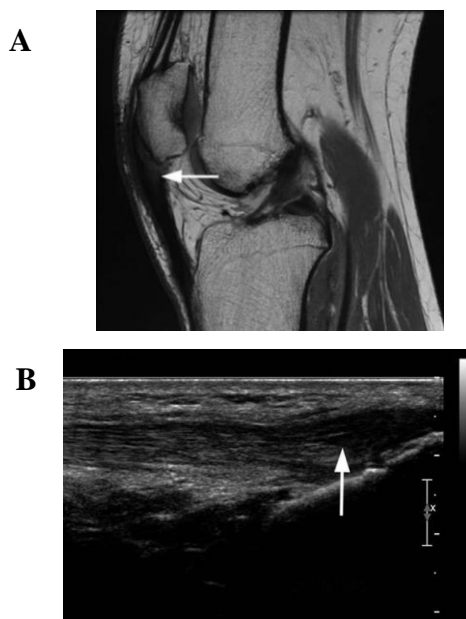
et al., 2018, FIGUEROA et al., 2016, SAINI et al., 2015). Entretanto, isso é influenciado pela posição que o tecido se encontra, uma vez que o tendão sob tensão diminui a dor significativamente, podendo até desaparecer. A palpação do tendão deve ser com sua total extensão, exercendo uma leve pressão no seu polo superior. Usando esse método, a dor à palpação pode ser classificada como leve, moderada ou severa. No entanto, para os atletas de elite são desenvolvidos procedimentos de treinamento para avaliação do seu desempenho atlético e o risco de desenvolvimento de lesão, uma vez que a dor leve pode ser considerada normal nos mesmos (COOK et al., 2001).

Um método objetivo para quantificar os sintomas da tendinopatia é utilizando o questionário VISA (*Victorian Institute of Sport Assessment*). Este método oferece um amplo espectro para classificar a tendinopatia, com base na avaliação dos sintomas, testes funcionais e habilidade para praticar esportes, no qual o melhor desempenho apresenta nota dez e o pior desempenho nota zero (MORTON et al., 2015).

Quanto aos exames para visualizar a lesão do tendão, os métodos por imagem, como ressonância magnética ou ultrassonografia, são bastante utilizados. A ressonância magnética é considerada a primeira escolha para diagnóstico da tendinopatia, pois além de possuir alta sensibilidade e especificidade (78% e 86%, respectivamente) (WARDEN; BRUKNER, 2003), ainda possui vantagem na capacidade de delinear a patologia intra-articular, permitindo um amplo espectro de doenças a serem incluídas no diagnóstico diferencial, como mostrado na figura 3A (FIGUEROA et al., 2016). No entanto, a utilização desse equipamento inclui maior custo, menor disponibilidade e um exame de tempo mais longo.

A ultrassonografia pode localizar lesões intratendíneas que aparecem como zonas de baixa ecogenicidade (Figura 3B). Além disso outros achados ultrassonográficos comuns incluem espessamento do tendão, irregularidade do paratenon, calcificações intratendinosas e erosões no local acometido (FIGUEROA et al., 2016). No entanto, em casos de tendinopatia patelar, a sensibilidade e especificidade da ultrassonografia no diagnóstico são menores que a ressonância magnética, cerca de 58% e 94%, respectivamente (WARDEN; BRUKNER, 2003). Desse modo, deve ser reservada para casos que a ressonância magnética não seja opção.

Figura 3 – Diagnóstico por imagem da tendinopatia patelar



Fonte: Adaptado de Figueroa et al. (2016). (A) Imagem de ressonância magnética mostrando aumento do sinal na região posterior do tendão patelar proximal e polo inferior da patela, com espessamento do tendão (seta). (B) Sonograma mostrando zonas de menor ecogenicidade (seta), tipicamente na porção posterior do tendão patelar adjacente ao polo inferior da patela.

Apesar dos exames por imagem serem tão eficientes no diagnóstico da tendinopatia, os mesmos apenas são visualizados em estágios avançados da doença, no qual já há degeneração parcial ou total do tecido (MAHONEY, 2017). Sendo assim, torna-se importante entender os fatores envolvidos na etiopatogenia da doença, de tal modo que possa contribuir para otimização do diagnóstico e/ou prognóstico precoce e direcionar o melhor tratamento a esta patologia.

2.2.6 Tratamento da tendinopatia

No geral, o tratamento da tendinopatia pode ser clínico ou cirúrgico (EVERHART et al., 2017; MURTAUGH; IHM, 2013). O tratamento clínico pode levar até seis meses, todavia nem sempre o atleta fica afastado de treinamentos devido a lesão (KHAN et al., 2000). Everhart et al. (2017) estudaram os métodos mais empregados para tratar a tendinopatia, e verificaram que vários tratamentos não cirúrgicos são significativamente eficazes para reduzir a dor dos pacientes, porém não observou significância quanto à recuperação na função do tendão.

Dentre estes métodos clínicos, a fisioterapia é a prática mais aplicada para tratamento da doença (MURTAUGH; IHM, 2013). Na qual, terapias com treinamentos

excêntricos têm sido o tratamento de escolha, principalmente agachamento para o tendão patelar e flexão plantar para o tendão de Aquiles, devido a melhorar tanto a morfologia do tendão como a neovascularização do mesmo, refletindo conseqüentemente na melhoria da dor e função do joelho e calcanhar (COUUPÉ et al., 2015, PINHO; RIBEIRO, 2015). Todavia, existem poucos estudos randomizados que comparam diferentes protocolos para a aplicação desta técnica para identificar a melhor forma de aplicar o exercício excêntrico (PINHO; RIBEIRO, 2015).

Deste modo, outras técnicas terapêuticas vêm sendo empregadas, como injeções com agentes esclerosantes e proloterapia para obliterar áreas de neovascularização, reduzindo a inflamação (HOKSRUD et al., 2012); ultrassom pulsado de baixa intensidade ou injeções de plasma rico em plaquetas (PRP) para promover a cicatrização do tecido e produção de colágeno 1 (EVERHART et al., 2017), terapia de ondas de choque para fortalecer a junção tendão-osso (WANG et al., 2002); e injeções de corticosteroides que são os menos eficazes, porque inibem as citocinas inflamatórias necessárias para a regeneração do tecido na fase inicial da doença (DAKIN et al., 2014; EVERHART et al., 2017).

Tratamentos com injetáveis vêm sendo opções promissoras para tendinopatia em atletas (LIN et al., 2019). A injeção de PRP é uma eficiente monoterapia na fase inicial da tendinopatia patelar, devido a aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF), auxiliando na remodelação do tecido tendíneo (LIN et al., 2019, McCARREL et al., 2012). Por outro lado, injeções com agentes esclerosantes e proloterapia são mais eficazes e seguros para tratar a tendinopatia de Aquiles (MORATH et al. 2018).

Entretanto, quando não há melhora dos sintomas pelo tratamento clínico é recomendado que o paciente seja encaminhado ao procedimento cirúrgico para promover uma resposta de cura. No entanto, 15% a 25% dos atletas que se submetem a cirurgia podem apresentar recorrência da degeneração tendínea e persistência da dor. Além disso, muitos atletas retornam ao esporte com desempenho inferior do que prévio à lesão (FERRETI et al., 2009).

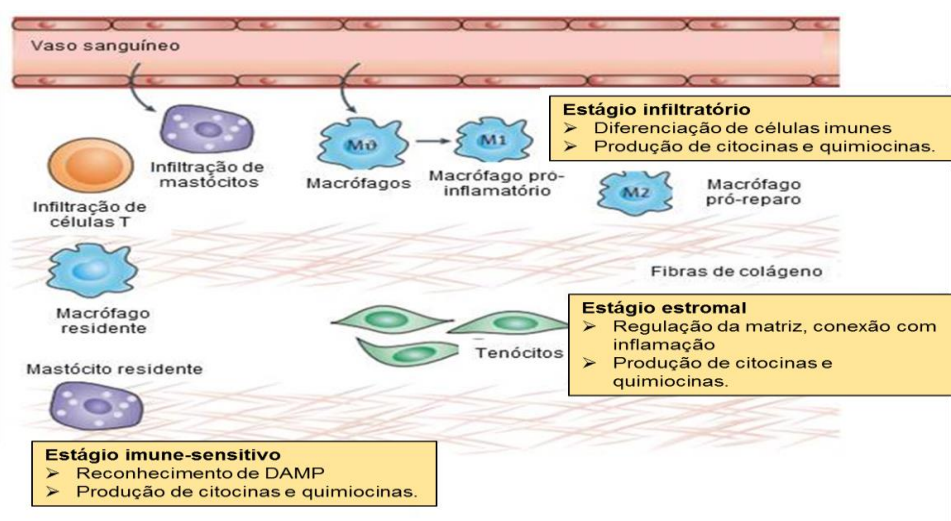
2.2.7 Fisiopatologia da tendinopatia

O ambiente biológico associado ao desenvolvimento da tendinopatia ainda são discutidos (MILLAR et al., 2016, GAIDA et al., 2012, DAKIN et al., 2018). No entanto,

com o surgimento de técnicas modernas, estudos vêm mostrando a associação de processos inflamatórios com as fases iniciais do desenvolvimento da tendinopatia, tanto em animais como em seres humanos (MILLAR et al., 2016, DAKIN et al., 2014, GAIDA et al., 2012, SALLES et al. 2018), já que possuem importante papel na homeostase do tendão, regulando a diferenciação e atividade celular, além da síntese da matriz tecidual (MILLAR et al., 2016; DAKIN et al., 2014).

O desencadeamento da inflamação na tendinopatia é dividido em três estágios distintos, que envolvem as diferentes células do sistema imunológico, bem como as células estromais (endotélio, epitélio, fibroblastos e nervos) que compõem a estrutura do tecido tendíneo (BUCKLEY et al., 2015). O primeiro estágio é conhecido como o influxo de células imunológicas por intermédio da ativação estromal e das células imunes residentes no tecido. Em circunstâncias normais, representa uma resposta inflamatória homeostática, mas em casos de tendinopatia, apresentam-se exacerbadas. O segundo é o estágio imune-sensitivo, no qual as células imunológicas inatas residentes no tendão (mastócitos e macrófagos) são ativadas por citocinas em resposta a lesão inicial. E, por fim, os tenócitos que são responsáveis pela remodelação e reparação do tecido, transformam-se em fenótipos inflamatórios expressando receptores imunes e secretando citocinas e quimiocinas, como interleucinas (IL), fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) de uma forma autócrina ou parácrina, resultando na produção excessiva e inadequada de proteínas e fibrose na matriz (figura 4) (MILLAR et al., 2017, MORITA et al., 2017).

Figura 4 - Imunobiologia da tendinopatia



Fonte: Adaptado de Millar et al. (2017).

Nos três estágios imunobiológicos há produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para um desequilíbrio imunológico no tendão. Estudos têm mostrado uma alta expressão gênica e proteica de TNF- α em tendão degenerado de animais e humanos (HOSAKA et al., 2005, MILLAR et al., 2009, GAIDA et al., 2012). Sabe-se que o aumento de TNF- α provoca uma resposta inflamatória exacerbada no tendão e ainda pode atuar na ativação e proliferação de células T CD4⁺, potencializando a atividade inflamatória tecidual (SAKABE; SAKAI, 2011; MILLAR et al., 2010). No entanto, como mecanismo homeostático, as células Treg são ativadas para modular a inflamação e favorecer a regeneração do tendão (BASSUNY et al., 2003; WANG et al., 2015).

Desse modo, a combinação entre o excesso de estresse mecânico submetido aos tendões e o perfil genético de cada indivíduo podem influenciar criticamente a resposta do sistema imunológico e contribuir para o desenvolvimento da tendinopatia (MAFFULLI et al., 2013; BLOMGRAN et al., 2016; MILLAR et al., 2017).

2.3 TENDINOPATIA E GENÉTICA

Estudos recentes têm demonstrado a influência de alterações moleculares ao desencadeamento da tendinopatia crônica (DINIZ-FERNANDEZ et al., 2018, EL KHOURY et al., 2018, DABIJA et al., 2017, SALLES et al., 2016, SEPTEMBER et al., 2016). Dabija et al. (2017) realizaram uma revisão sistemática a fim de verificar a predisposição genética e familiar à tendinopatia no manguito rotador. Dentre os trabalhos revisados, um estudo de coorte com seguimento de cinco anos (GWILYM et al., 2009) demonstrou que os irmãos de um indivíduo com uma lesão do manguito rotador foram mais propensos a desenvolver ruptura total do tendão e sintomas associados à tendinopatia. Outro estudo demonstrou uma associação entre indivíduos com ruptura total do tendão e histórico familiar para tendinopatia (TASHJIAN et al., 2014). Três estudos verificaram que polimorfismos e haplótipos nos genes *DEFB1*, *FGFR1*, *FGF3*, *ESRRB*, *FGF10*, *SAP30BP* e *SASH1* estavam associados a predisposição genética da tendinopatia no manguito rotador (DA ROCHA MOTTA et al., 2014; TEERLINK et al., 2015; TASHJIAN et al., 2016).

Os polimorfismos genéticos são marcadores moleculares caracterizados pela variação de alelos num determinado local do cromossomo (locus), que ocorre em pelo menos 1% da população (ROCHA et al., 2007). Dentre os polimorfismos, existem os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs), nos quais apenas duas bases nitrogenadas diferentes (podendo ser adenina, timina, citosina ou guanina) podem ocupar uma

localização específica no genoma (THOMPSON et al, 2001).

Os processos envolvidos na fisiopatologia da tendinopatia podem ser modulados por genes polimórficos, que podem alterar a expressão ou atividade de suas proteínas, contribuindo para um fenótipo diferenciado nos indivíduos doentes (SALLES et al., 2016, TASHJIAN et al., 2016, TEERLINK et al., 2015, DA ROCHA MOTTA et al., 2014). Porém, para entender a importância de cada alelo polimórfico, é necessário avaliar a contribuição de cada polimorfismo no fenótipo da doença (MAGRA; MAFFULLI, 2007).

Além disso, estudos com atletas de alto desempenho podem ser eficazes para avaliar a contribuição genética a suscetibilidade da tendinopatia, devido essa população ser altamente exposta a estresse mecânico intenso no tendão (SEPTEMBER et al., 2016). Nosso grupo vem se aprofundando em estudos de polimorfismos genéticos com o desenvolvimento da tendinopatia em atletas, no qual em um primeiro estudo avaliamos a influência de polimorfismos na via angiogênica e o desenvolvimento da doença. Investigamos SNPs localizados nos genes do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*VEGF*) e seu receptor tipo 2 (*VEGFR2*), codificado pelo gene Receptor Domínio Kinase (*KDR*), e verificamos que a presença do genótipo heterozigoto do polimorfismo *KDR 1192G>A* gene foi negativamente associado (OR: 0,41; IC95%: 0,19 - 0,88) ao desenvolvimento da tendinopatia em atletas de elite (SALLES et al., 2016). A plausível explicação biológica para este achado é que este polimorfismo, localizado no éxon 7 de *KDR*, altera a conformação do receptor, afetando a eficiência da ligação do VEGF-*VEGFR2* (WANG et al., 2007).

Recentemente, estudos de variantes imunogenéticas têm sido importantes para a compreensão do mecanismo molecular envolvido na etiologia da doença e para o controle do estresse mecânico no tendão de atletas com maior probabilidade de desenvolver lesões por uso excessivo (KIM et al., 2017, DINIZ-FERNANDEZ et al., 2018, NIE et al., 2019). O excesso de produção e liberação de agentes pró-inflamatórios derivadas de sobrecarga e estresse mecânico causa alteração na proliferação celular, início da dor e degradação da matriz extracelular.

2.4 GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DA TENDINOPATIA

2.4.1 Papel de genes moduladores das células T regulatórias

As células Treg são uma população de linfócitos heterogêneos cuja função primordial é manter a tolerância periférica por meio da modulação imunológica em

respostas à inflamação, infecção, alergia, transplantes e imunidade tumoral (HORI et al., 2003). Expressam o fator transcricional forkhead-box3 (FOXP3) que interage com o fator nuclear das células T ativadas (NFAT) promovendo a diminuição da transcrição dos genes que codificam as interleucinas 2 e 4 (IL-2 e IL-4) e do interferon gama (INF- γ). E ainda, atuam aumentando a expressão do receptor de IL-2 (CD25), que promove um efeito supressor na proliferação dos linfócitos T efetores (figura 5) (LOPES et al., 2006; WU et al., 2006).

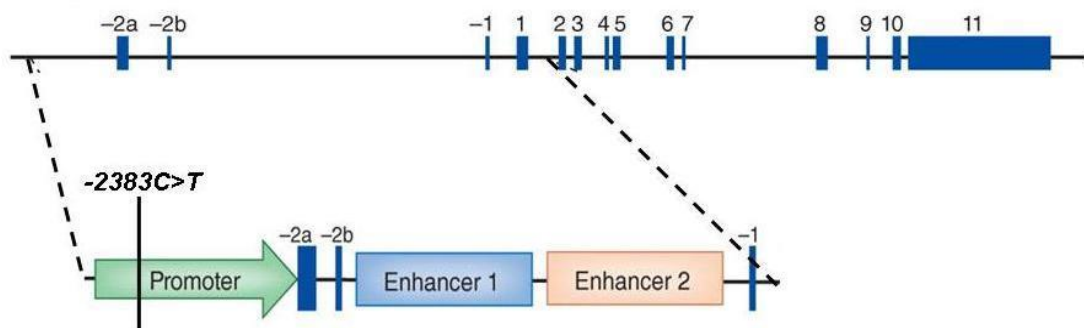
Figura 5 - Regulação de FOXP3 nas células T regulatórias



Fonte: Adaptado de Muller; Rao (2010). Os complexos NFAT-API (proteína ativadora 1) induzem a expressão de IL-2. Entretanto, os complexos NFAT-FOXP3 inibem a expressão de IL2.

O fator FOXP3 é codificado pelo gene com o mesmo nome, o qual está localizado na posição 11.23 do braço curto do cromossomo X (Xp11.23), e contém onze éxons. Sua expressão é modulada por polimorfismos localizados em regiões não codificantes, dentre eles o SNP *FOXP3* -2383C>T (rs3761549), localizado na região promotora que ainda apresenta mecanismo biológico desconhecido (figura 6) (ODA et al., 2013; HAGHIGHI et al., 2015).

Figura 6 - Estrutura do gene *FOXP3* e a localização do SNP -2383C>T (rs3761549)



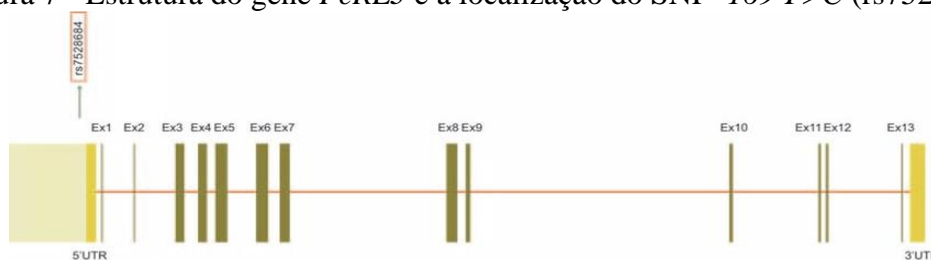
Fonte: Adaptado de Tone; Greene (2011). Os retângulos numerados indicam os éxons.

Além da expressão do fator FOXP3, o fator homólogo dos receptores Fc γ III clássicos (FcRL3), também está expresso nas células Treg e modula negativamente sua

atividade supressora (SWAINSON et al., 2010). Esse fator é codificado pelo gene do mesmo nome (*FcRL3*), que está localizado na posição 23.1 do braço longo do cromossomo 1 (1q23.1) e contém treze éxons. O *FcRL3* faz parte de uma família de genes que codifica receptores Fc clássicos e modulam funções no sistema imune, afetando vias de sinalização imunológicas (BAJPAI et al., 2012).

Estudos vêm demonstrando uma modulação polimórfica bem acentuada para a expressão e a atividade do *FcRL3* (ZHANG et al., 2015; MENDONZA et al., 2015; LAN et al., 2015; PAWŁOWICZ et al., 2016). O alelo variante do SNP *FcRL3*-169T>C (rs7528684), localizado na região promotora desse gene (figura 7), já foi associado ao aumento da expressão gênica e, conseqüentemente, maior codificação do fator FcRL3. A superexpressão desse fator altera a afinidade de ligação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) ao DNA, inibindo a função supressora das células Treg (BAJPAI et al., 2012, SWAINSON et al., 2010).

Figura 7 - Estrutura do gene *FcRL3* e a localização do SNP -169 T>C (rs7528684)



Fonte: Adaptado de Lan et al. (2015).

Estes dois polimorfismos vêm sendo bastante estudado em diversos fenótipos patológicos, devido apresentarem alta frequência na população e alterar a atividade das células Treg, no entanto nenhum estudo avaliou a influência desses dois polimorfismos atuando na tendinopatia. A tabela 1 mostra a frequência do menor alelo destes SNPs (*FOXP3* -2383T e *FcRL3* -169C) em diferentes populações saudáveis, inclusive no Brasil.

Tabela 1 – Variação da frequência (%) do menor alelo dos SNPs *FOXP3* -2383C>T e *FcRL3* – 169T>C em diferentes populações saudáveis estudadas.

Grupo Populacional	<i>FOXP3</i> -2383T	<i>FcRL3</i> -169C
Africanos	11,3 – 12,6	87 – 94
América do Norte		
Americanos	8 – 12	46 – 49
Mexicanos	-	50,5
América do Sul		
Brasileiros	6,5 – 7	35 – 38
Ásia		
Sul Asiático	34 – 49	25 – 33
Oriente (Chineses, Coreanos)	18,3 – 33,0	37,9 – 43,7
Europeus	7 – 12	42,1 – 48,4
Oceania		
(Australianos e Neozelandês)	-	6,3 – 12,1
Oriente Médio		
(Árabes, Argelianos, Egípcios, Iranianos e Tunisianos)	2 – 6,3	-

Fonte: Autoria própria. - Polimorfismo não investigado.

2.4.2 Papel do gene *TNF- α*

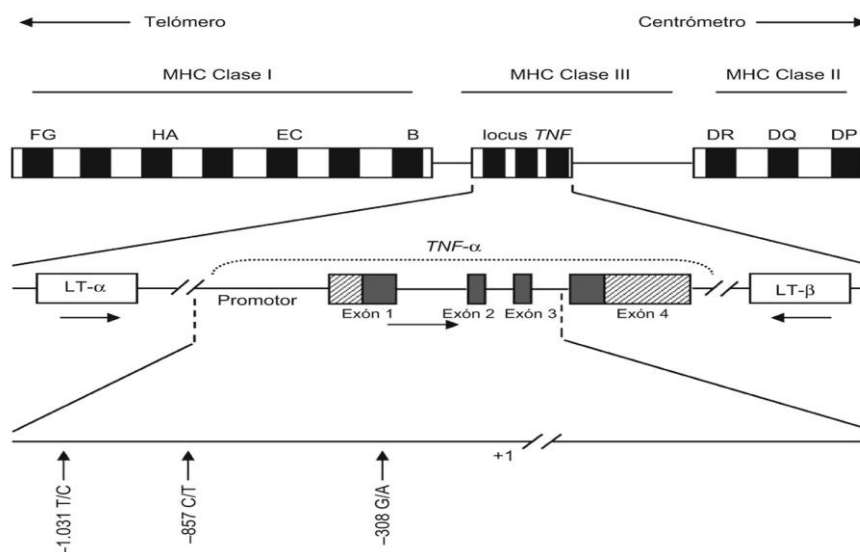
O fator de necrose tumoral tipo α é uma citocina pró-inflamatória que é capaz de induzir uma intensa resposta inflamatória por regular positivamente agentes pró-inflamatórios, incluindo interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), metaloproteinases de matriz 1 e 3 (MMP-1 e MMP3), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e prostaglandina E2 (PGE₂). Esta regulação positiva do TNF- α está associada à apoptose, que é uma característica da tendinopatia crônica (REES et al., 2014). As funções do TNF- α são mediadas por dois receptores distintos de TNF 1 e 2 (TNFR1 e TNFR2), que existem tanto como monômeros na superfície celular quanto nas formas solúveis (REGO-PÉREZ et al., 2008, SMITH et al., 1994). O TNFR1 é expresso em diversos tipos celulares e sua ligação com TNF- α induz apoptose e efeitos pró-inflamatórios, enquanto que a sinalização TNF- α - TNFR2 está relacionada a modulação da inflamação e reparo tecidual, devido a expressão

de TNFR2 ser expressa predominantemente nas células Treg (YANG et al. 2018, IHNATKO; KUBES, 2007).

Estudo de modelos animais mostram uma alta expressão de TNF- α na tendinopatia crônica, enquanto que no tendão saudável são indetectáveis (DAKIN et al., 2014, UCHIDA et al., 2005, HOSAKA et al., 2002). Um modelo experimental de tendinopatia crônica provocado por uso excessivo mostrou que os níveis de expressão de RNAm do *TNF- α* aumentou 11 vezes no tendão degenerado em comparação com tendão saudável (MILLAR et al, 2009). Além disso, uma maior expressão de TNF- α e seus receptores foi encontrada em tenócitos humanos de núcleo arredondado e aumentado, que são característicos de tendinopatia (SPANG et al., 2017, MORITA et al., 2017, GAIDA et al., 2012). Excessos ou mudanças na força mecânica podem induzir a secreção de TNF- α e assim estimular a produção da colagenase, enzima responsável pela clivagem da matriz de colágeno do tendão, resultando na perda da integridade biomecânica da matriz de tendão (UCHIDA et al., 2005).

Aproximadamente 60% da variação na produção de TNF- α pode ser geneticamente determinada, indicando uma forte influência genética na produção de citocinas (REGO-PÉREZ et al., 2008, VERWEIJ, 1999). O gene que codifica o TNF- α possui o mesmo codinome, está localizado no cromossomo 6p21.3 (ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124) e é constituído por quatro éxons e três íntrons. Os éxons I e II contêm a sequência peptídica líder (PARAMESWARAN et al, 2010). Esse gene está organizado em conjunto com o *TNF-B* na chamada região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe III - MHC III, entre o gene do antígeno leucocitário humano tipo B (*HLA-B*), localizado na região MHC I, e o gene HLA do tipo DR (*HLA-DR*), localizado na região MHC II (figura 8). Todavia, apesar do *TNF- α* estar nessa região de MHC, ele não faz reconhecimento de antígeno (REGO-PÉREZ et al., 2008, ALI et al., 2000).

Figura 8 - Representação esquemática do gene do fator de necrose tumoral tipo α (*TNF- α*)



Fonte: Adaptado de Rego-Pérez et al. (2008). O *TNF- α* está nessa região de MHC III e apresenta quatro éxons. Os principais SNPs do gene estão localizados na sua região promotora.

Polimorfismos do gene *TNF- α* têm sido associados a diversas doenças, como, por exemplo, doenças autoimunes, degenerativas e metabólicas, além do câncer (KIM et al., 2018, JAHID et al., 2017, PENG; LI et al., 2015). Os principais SNPs estão localizados na região promotora do gene (figura 8), dentre os quais se destacam o *TNF- α* -1031 *T*>*C* (rs1799964), *TNF- α* -857*C*>*T* (rs1799724) e o *TNF- α* -308*G*>*A* (rs1800629) por alterarem a expressão do gene (UDALOVA et al., 2000) e apresentarem alta frequência na população (REGO-PÉREZ et al., 2008). A tabela 2 mostra a frequência do menor alelo dos SNPs *TNF- α* (-1031 *T*>*C*, -857*C*>*T*, -308*G*>*A*), respectivamente em diferentes populações saudáveis, inclusive no Brasil.

Tabela 2 – Variação da frequência (%) do menor alelo dos SNPs *TNF- α* (-1031 T>C, -857C>T, -308G>A) em diferentes populações saudáveis estudadas.

Grupo Populacional	<i>TNF-α</i>		
	-1031C	-857T	-308A
África	-	-	18,7
América do Norte			
Canadenses e Estadunidenses	18,4 – 21,2	6,8 – 10,2	10,5 – 18,3
Mexicanos	15,8 – 22,9	16 – 25,8	3,3 – 9
América do Sul			
Brasileiros	18 – 28	10 – 21	7,9 – 16
Colombianos	18,1	18,1	6,9
Ásia			
Indianos	18,2 – 44,4	31,2	35,8
Oriente (Chineses, Coreanos)	1 – 19,8	9,8 – 14,7	7,1 – 9,6
Europa Ocidental			
(Espanhois, Franceses e Suecos)	21 – 22	8 - 9,5	17 – 22,8
Europa Oriental			
(Croatas, Húngaros, Poloneses e Romenos)	13,2 – 19	13,1 – 20,2	9,9 – 16,2
Oceania	-	6,3 – 12,1	14,4
Oriente Médio			
(Árabes, Iranianos e Tunisianos)	14,4 – 30,2	7,5 – 31,3	15,1 – 29,5

Fonte: Autoria própria. - Polimorfismo não investigado.

Os polimorfismos de *TNF- α* ainda não foram estudados em indivíduos com tendinopatias. No entanto, é de se esperar que os polimorfismos na região promotora do gene provoquem algum efeito na expressão de *TNF- α* , assumindo assim um importante papel no desenvolvimento da tendinopatia.

3 JUSTIFICATIVA

A tendinopatia é uma doença multifatorial e degenerativa do tendão, caracterizada como um problema de saúde pública, pois gera impactos sócios econômicos e afeta diretamente a qualidade de vida dos indivíduos expostos a riscos ergonômicos. A contribuição de polimorfismos genéticos no desenvolvimento da doença tem sido eficaz para melhor compreensão de sua etiologia.

Os atletas são profissionais expostos a elevada intensidade e frequência de treinamentos, o que pode saturar a absorção de cargas mecânicas dos tendões e conseqüentemente ao desenvolvimento da tendinopatia. Nosso grupo vem se aprofundando no estudo da tendinopatia em atletas, buscando SNPs que possam estar associados com a doença. Nesse contexto, estudos vêm discutindo os mecanismos moleculares envolvidos no processo inflamatório para o desencadeamento da tendinopatia. É sabido que em tendões degenerados há uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias em relação a tecidos saudáveis. Além disso, o acúmulo de agentes pró-inflamatórios ativa as células Treg para modular a inflamação e favorecer a regeneração tecidual. Dessa forma, torna-se relevante estudar SNPs envolvidos com o microambiente inflamatório do tendão com o intuito de identificar os mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da tendinopatia, que possam contribuir com o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos ou programas de vigilância da lesão, afim de mitigar o impacto negativo da doença no âmbito da saúde pública.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a influência de polimorfismos dos genes *FOXP3*, *FcRL3* e *TNF- α* no desenvolvimento da tendinopatia.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Descrever as características demográficas, clínicas e esportivas dos indivíduos incluídos no estudo;
- ✓ Determinar a frequência dos polimorfismos *FOXP3* -2383C>T, *FcRL3* -169T>C, *TNF- α* -308G>A, -857C>T, -1031 T>C na população de estudo;
- ✓ Avaliar a magnitude de associação dos polimorfismos estudados no desenvolvimento da tendinopatia e nos sintomas clínicos.

5 METODOLOGIA

O presente estudo é derivado de um projeto maior denominado “Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com o desenvolvimento de lesões atraumáticas em atletas”, que foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO), número 2.455.630 (ANEXO A).

5.1 DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DO ESTUDO

Este trabalho foi realizado por meio de um estudo analítico observacional do tipo caso-controle de base populacional com atletas brasileiros de 18 a 45 anos de idade. Todos os participantes responderam a um questionário, elaborado pelo nosso grupo e previamente validado por especialistas (ortopedistas, médicos esportivos, fisioterapeutas, epidemiologistas e treinadores), que foi aplicado em um estudo transversal com uma amostra de 627 atletas para identificar a prevalência e fatores associados as lesões musculoesqueléticas (ANEXO B). O questionário consiste em três seções: informações gerais, esportivas e específicas sobre lesões. As informações gerais correspondem as características sócio demográficas: idade, sexo, altura, índice de massa corporal (IMC), autoclassificação de cor da pele, nível de escolaridade e renda familiar, como também as características clínicas: acompanhamento nutricional devido ao esporte, consumo de álcool e tabagismo. As informações esportivas e de treinamento englobam as variáveis: modalidade esportiva, membro dominante, preparador de treinamento, idade que iniciou a prática esportiva, anos de treinamento e carga horária semanal de treinos. Por fim, as informações específicas sobre histórico de tendinopatia incluem: local acometido, número de episódios, tempo de afastamento das atividades esportivas devido a lesão e confirmação do diagnóstico por laudo clínico e/ou exame de imagem. Cada questionário foi identificado com o local de recrutamento, seguido pelo número de identificação do atleta conforme ordem de recruta, nome e data de nascimento do participante. A maioria das questões eram de múltipla escolha para fácil compreensão. No entanto, após o término do preenchimento, um observador treinado averiguou se as questões foram devidamente respondidas e os dados obtidos foram arquivados em um banco de dados, o qual foi duplamente conferido por diferentes pesquisadores treinados.

Para cumprir com os objetivos específicos propostos no item 4.2, foi realizado o cálculo amostral pelo programa *Genetic Power Calculadora*

(<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/>) assumindo um poder de 0,8 e 5% de erro do tipo I, no qual eram necessários, pelo menos, 125 casos de tendinopatia e 125 atletas controles. Desse modo, foram empregadas duas seleções distintas dos participantes de estudo: uma para análise dos polimorfismos *FOXP3* -2383C>T e *FcRL3* -169T>C e outra para os polimorfismos de *TNF- α* (-1031 T>C, -857C>T, -308G>A) influenciando o desenvolvimento da doença.

5.2 SELEÇÃO DE CASOS E CONTROLES

5.2.1 Seleção de atletas para análise dos polimorfismos *FOXP3* -2383C>T e *FcRL3* -169T>C

Duzentos e setenta e um atletas de voleibol foram recrutados entre dezembro de 2011 a março de 2012 (N = 138) em um campeonato nacional e janeiro a julho de 2014 (N = 133) no centro de treinamento da Federação Brasileira de Voleibol (CBV), localizado na cidade do Rio de Janeiro - RJ, Brasil. O critério de inclusão para o grupo casos de tendinopatia (N = 146) foram atletas de elite coligados a confederação brasileira de voleibol (CBV), que relataram no questionário histórico da doença, e que ainda apresentavam confirmação com exame de imagem por ressonância magnética (RM) do tendão afetado, juntamente com laudo clínico da CBV informando sobre dor progressiva relacionada ao treinamento nos últimos 6 meses, espessamento nodular palpável, sensibilidade à palpação e inchaço na área do tendão afetado. Por sua vez, o grupo controle (N = 125) foi composto por atletas coligados a confederação brasileira de voleibol (CBV), sem evidências de tendinopatia pelo exame de ressonância magnética e sem achados clínicos da CBV que atendam aos critérios da doença. A figura 9 mostra o fluxograma da população de estudo recrutada para essa análise.

Figura 9 – População de estudo recrutada para análise dos polimorfismos *FOXP3* - $2383C>T$ e *FcRL3* - $169T>C$.



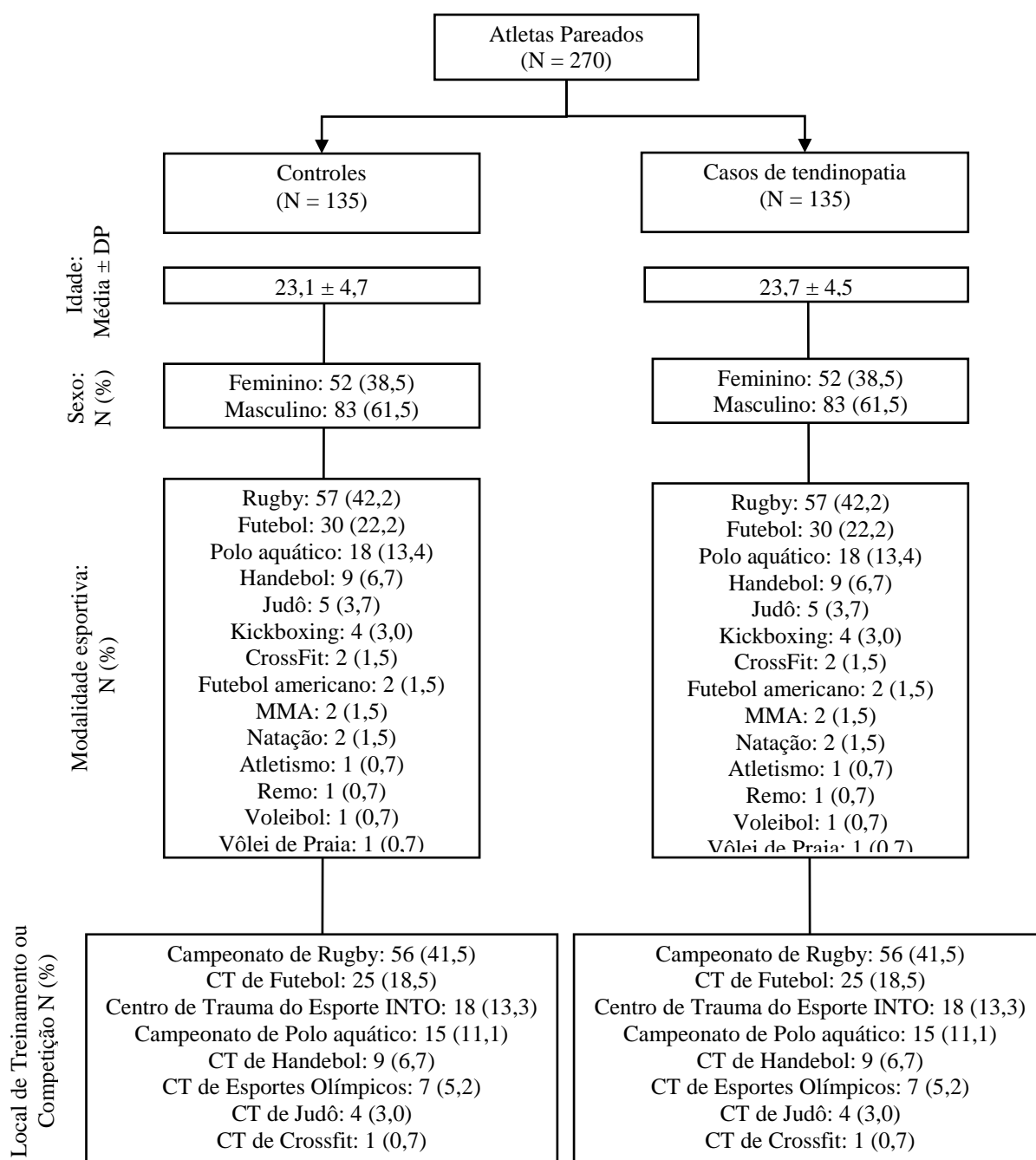
Fonte: Autoria própria.

5.2.2 Seleção de atletas para análise dos polimorfismos *TNF- α* ($-308G>A$, $-857C>T$, $1031 T>C$)

Foi realizado um estudo pareado com 270 atletas de diferentes modalidades esportivas recrutados no Centro de Trauma do Esporte do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), nos Centros de Treinamentos ou Campeonatos Esportivos, no período de fevereiro de 2018 até outubro de 2019. O critério de seleção entre casos e controles foi pelas informações contidas no questionário, como idade, sexo, esporte praticado, local de treinamento e diagnóstico de tendinopatia, confirmado por ortopedistas com exame clínico ou imagem de ressonância magnética (RM). O grupo casos (N = 135) foi composto pelos atletas que autorrelatarem diagnóstico prévio clínico ou por RM de tendinopatia e que informaram sobre o local, número de episódios e tempo de afastamento da prática esportiva devido à doença. No entanto, como se trata de casos prevalentes e de informações autodeclaradas, os controles selecionados (N = 135) foram os atletas sem histórico de lesão musculoesquelética e que não relataram confirmação clínica e a presença de sintomas prévios da tendinopatia. Desse modo, para cada caso, um controle foi pareado quanto à idade (± 2 anos), sexo, modalidade esportiva e local de treinamento (figura 10).

O critério de exclusão do estudo foram os atletas que apresentaram histórico de lesão musculoesquelética por motivo não relacionado à prática esportiva e os quais não permitiram a coleta de material biológico.

Figura 10 – Pareamento da população de estudo para análise dos polimorfismos *TNF- α* (-1031T>C, -857C>T, -308G>A)



Fonte: Autoria própria. CT = Centro de Treinamento

5.3 COLETA DE DADOS

Por meio do banco de dados obtido, conforme citado no item 5.2, para avaliar as características epidemiológicas, clínicas, esportivas e de treinamento dos atletas do estudo, foram utilizadas as variáveis idade, sexo, cor da pele (branca, intermediária, preta, amarela ou indígena), nível de escolaridade (ensino médio, ensino médio ou superior), medidas

antropométricas (altura, massa corporal e índice de massa corporal - IMC), acompanhamento nutricional, tabagismo, consumo de álcool, modalidade esportiva, nível competitivo, expertise do treinador, idade no início da prática esportiva, anos de treinamento e horas semanais de treinamento.

Além disso, no estudo não – pareado com atletas de voleibol, para reduzir a ocorrência de viés de seleção, as idades dos atletas foram categorizadas em subgrupos, conforme classificação da Confederação Brasileira de Voleibol, em sub18, sub23 e adultos (CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE VOLEIBOL, 2017).

5.4 COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO

O DNA genômico foi obtido a partir da amostra de mucosa oral pelo kit de esfregaço *Invisorb® Spin* (Qiagen, Alemanha). Para coletar uma amostra, foi raspado o swab firmemente contra o interior de cada bochecha 6 vezes. O mesmo foi seco ao ar por pelo menos 2 h após a coleta.

A extração de DNA do material de esfregaço foi realizada de acordo com o kit de esfregaço Qiagen, que para a lise do material de partida foi transferido o esfregaço para um tubo de reação de 1,5 ml preparado com 600 µl de tampão de lise G e 20 µl de Proteinase K e incubado a amostra a 65 ° C durante 15 minutos sob agitação contínua. Depois, foi adicionado e misturado 300 µl de tampão de ligação A ao tubo de reação. Seguindo, foi adicionado um filtro de spin em um tubo receptor 2,0 ml, no qual foi transferido a suspensão para ser centrifugado por 2 min a 11.000 x g (11.000 rpm). A lavagem da amostra no filtro de spin de volta no tubo receptor de 2,0 ml foi realizada duas vezes com 700 µl de tampão de lavagem adicionado ao filtro e centrifugado a 11.000 x g (11.000 rpm) durante 1 min, respectivamente. Por fim, o tubo foi centrifugado durante 4 minutos à velocidade máxima para a remoção completa de etanol, em seguida, colocado o filtro de spin em um novo tubo receptor de 1,5 ml e adicionado 50-100 µl de tampão de eluição pré-aquecido. No final, foi incubado por durante 1 min à temperatura ambiente e centrifugado a 11.000 x g (11.000 rpm) por 1 minuto, obtendo o DNA no tubo coletor.

A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas pelo uso de um espectrofotômetro Nanodrop® (*Thermo Scientific*, Wilmington, EUA). A concentração de DNA foi avaliada no comprimento de onda de 260nm. A possível presença de contaminantes ou proteínas foi avaliada a 230 ou 280nm, respectivamente. As razões de absorvância A2600/230 e A260/A280 foram determinadas para verificar a pureza do DNA.

A análise dos polimorfismos dos genes selecionados foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando o sistema TaqMan. O DNA foi amplificado utilizando oligonucleotídeos e sondas específicos, validadas e adquiridas da empresa AppliedBiosystems®. A tabela 3 resume os conjuntos de sondas e oligonucleotídeos que serão utilizados para a análise de cada SNP.

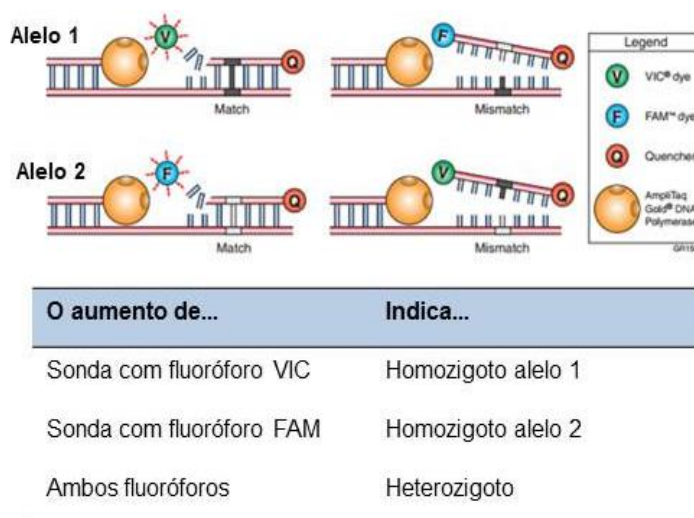
Tabela 3 - Ensaio TaqMan (sondas e oligonucleotídeos) para genotipagem dos SNPs estudados dos genes *FOXP3*, *FcRL3* e *TNF- α* .

SNP	Substituição de nucleotídeo	Código da Sonda	Oligonucleotídeo
rs3761549	C / T	C_27058744_10	5' CTGAGACTTTGGGACCGTAG 3' 5' TCGCGCCGGGCTTCAICGACA 3'
rs7528684	T / C	C_27058744_10	5' CTGAGACTTTGGGACCGTAG 3' 5' TCGCGCCGGGCTTCAICGACA 3'
rs1800629	G / A	C___7514879_10	5'- CCTCAAGCCTGCCACCAAGC -3' 5'- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG -3'
rs1799724	C / T	C__11918223_10	5'- TCTACATGGCCCTGTC -3' 5'- TTTCATTCTGACCCGGAGAC -3'
rs1799964	T / C	C___7514871_10	5'- CCTCTACATGGCCCTGTCTT -3' 5'- CAAAGGAGAAGCTGAGAAGA -3'

Fonte: Autoria própria

O sistema Taqman é baseado no uso de uma sonda que possui um fluorocromo em cada ponta de sua sequência e é direcionada a uma região de sequência do DNA que se deseja amplificar. O fluorocromo na posição 3' atua como um capturador de energia (quencher) e impede a emissão de fluorescência do fluorocromo repórter, que se encontra na região 5', responsável pela emissão de fluorescência. À medida que a Taq polimerase começa a sintetizar a nova fita, vai degradando a sonda à sua frente, liberando o fluorocromo quencher e permitindo que o fluorocromo repórter absorva energia, resultando em um aumento da intensidade de fluorescência. Portanto, cada sonda conjugada com o fluoróforo é clivada durante a etapa de extensão pela ação exonuclease da DNA polimerase, e ao emitir o sinal de fluorescência é detectado pelo termociclador. Logo, a discriminação alélica mede a alteração na fluorescência dos fluoróforos associados com as sondas. Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial (FONSECA, 2016). A representação da metodologia Taqman encontra-se na figura 11.

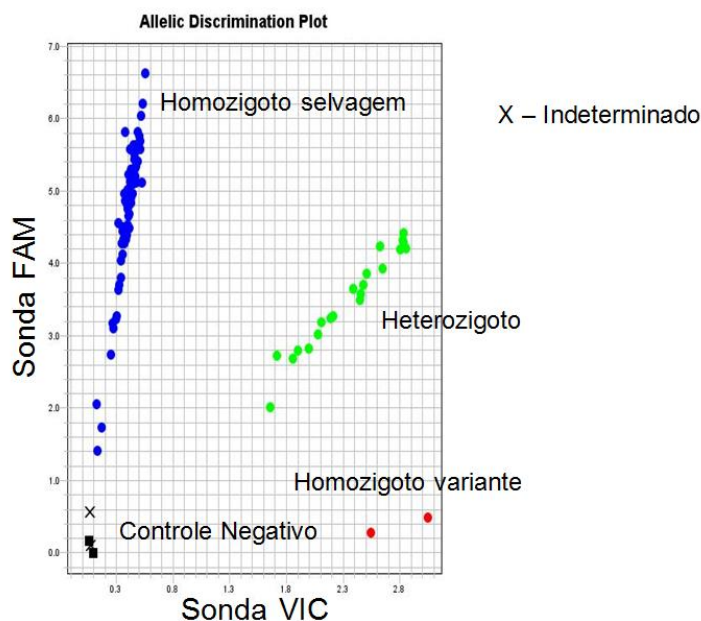
Figura 11 - Descrição do sistema Taqman



Fonte: Adaptado de <http://www.dnalink.com/english/service/taqman.html>. Acesso em: 27/11/2019. A figura mostra os resultados na presença ou ausência de hibridização entre as sequências alvos e sondas, e também a relação entre os sinais de fluorescência e as sequências da amostra.

Para todos os ensaios, as reações de PCR em tempo real serão realizadas em um volume final de 8 ul, com 30 ng de DNA, 1x *Taqman Universal Master Mix* (Applied Biosystems), 1x de cada ensaio específico de oligo e sonda, e H₂O q.s.p. Após isso, foi colocado as amostras em placa de 96 poços, no qual o desenho dessa placa era composto por dois poços da placa com branco, dois com controle homozigoto selvagem, dois com homozigoto recessivo, dois com heterozigoto e o restante dos poços (N=84) com as amostras dos atletas do estudo. As condições da PCR serão: 95°C por 10 minutos, acompanhados de 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 1 minuto. A detecção dos alelos será realizada após 1 minuto a 60°C no aparelho *LineGene 9600 Series*, e, em seguida, os genótipos serão determinados diretamente, conforme figura 12.

Figura 12 – Exemplo de discriminação genotípica obtida por PCR em tempo real



Fonte: Autoria própria.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A determinação da normalidade da população analisada foi verificada pelo teste de Shapiro – Wilk ou pelo teste Kolmogorov – Smirnov. As diferenças entre as médias das variáveis contínuas, dos diferentes grupos esportivos, foram avaliadas usando o teste t-student enquanto as diferenças entre as proporções das variáveis categóricas sócio demográficas, clínicas, esportivas e treinamento forma avaliadas pelo teste Chi-quadrado χ^2 , sendo considerado um grau de significância de 5%.

As frequências alélica, genotípica e haplotípica dos polimorfismos *FOXP3* - 2383C>T, *FcRL3* -169T>C e *TNF- α* (-1031 T>C, -857C>T, -308G>A) foram determinadas por contagem direta dos alelos e analisadas pelo teste de Fisher ou teste χ^2 , após constatar o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE). Os intervalos de confiança (95%) para os percentuais de frequências foram calculados pela estimativa da probabilidade de parâmetros multinomiais. O coeficiente dos haplótipos e os padrões de desequilíbrio de ligação (*D'* que é o grau de desequilíbrio no módulo e o *R2* que é o grau de correlação) foram mensurados utilizando o programa Haploview (Haploview versão 4.2), com base no algoritmo de maximização de expectativa (BARRETT et al., 2005).

Para avaliar a magnitude de associação entre os polimorfismos de interesse e o desenvolvimento da tendinopatia, as razões de chances brutas e ajustadas (OR) com seus

respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%) foram estimadas usando o método de regressão logística multivariada não condicional. O modelo de ajuste empregado para controlar os possíveis fatores de confundimento da análise, considerou a importância biológica de cada variável e o grau de significância estatística na análise univariada, na qual entraram no modelo as variáveis com nível de significância menor ou igual a 0,25 ($P \leq 0,25$), porém permaneceram apenas as quais apresentaram nível de significância de 0,05 ($P \leq 0,05$) após saída do modelo.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA, versão 20.0) e um nível de significância menor de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5.6 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os atletas convidados a participarem do estudo receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO C), no qual foram orientados a lê-lo cuidadosamente e a questionar a respeito de qualquer dúvida quanto ao projeto. Assim, todos os atletas que concordaram em participar do estudo, assinaram o TCLE e receberam uma cópia original deste documento assinada pelo pesquisador responsável do projeto. Todas informações pessoais foram mantidas confidencialmente e apenas os investigadores envolvidos com o presente estudo tiveram acesso as mesmas.

6 RESULTADOS

Os dados obtidos neste estudo constituíram dois artigos e serão apresentados individualmente em duas partes, assim denominadas: “Polimorfismo *Fc receptor-like 3* (-169T>C) aumenta o risco da tendinopatia em atletas de voleibol: um estudo de caso – controle (*Fc receptor-like 3 (-169T>C) polymorphism increases the risk of tendinopathy in volleyball athletes: a case control study*)”, que foi publicado na revista *BMC Medical Genetics* em julho de 2018, e “Polimorfismos do gene *fator de necrose tumoral tipo alfa* (*TNF- α*) aumentam o risco de tendinopatia em atletas: um estudo de caso-controle (*Tumor necrosis factor alpha polymorphisms increases the risk of tendinopathy in athletes: a case-control study*)”, que foi submetido em março de 2020 para a revista *Journal of Science and Medicine in Sport*.

6.1 POLIMORFISMO *FC RECEPTOR-LIKE 3* (-169T>C) AUMENTA O RISCO DA TENDINOPATIA EM ATLETAS DE VOLEIBOL: UM ESTUDO DE CASO – CONTROLE

Neste artigo foi avaliada a influência dos polimorfismos *FOXP3* – 2383C>T e *FcRL3* -169T>C que regulam a atividade das células Treg e o desenvolvimento da tendinopatia em atletas de voleibol. Participaram deste estudo 146 atletas (19,9% mulheres e 80,1% homens) previamente diagnosticados com tendinopatia por exame de ressonância magnética, com laudo médico emitido da Confederação Brasileira de Voleibol, e 125 atletas (41,6% mulheres e 58,4% homens) sem histórico da doença e que não apresentavam sinais e sintomas clínicos.

A frequência dos locais acometidos pela tendinopatia foi de 63% no tendão patelar, 22% do manguito rotador e 15% no tendão de Aquiles. Os fatores de risco associados a tendinopatia, considerando o perfil epidemiológico dos atletas, foram a idade avançada (OR = 8,75; IC95% = 4,33–17,69), o sexo masculino (OR = 2,87; IC95% = 1,67–4,93) e o maior tempo de prática no voleibol (OR = 8,38; IC95% = 3,56–19,73). Na análise genética, a distribuição genotípica e alélica do polimorfismo *FcRL3* -169T>C foi significativamente diferente entre os grupos (casos de tendinopatia e controles). Após a análise ajustada pelos fatores de confundimento, o alelo variante *FcRL3* -169C foi associado positivamente tanto ao desenvolvimento da tendinopatia (OR = 1,44; IC95% = 1,02–2,04), quanto as características clínicas da doença, tais como presença de dor no tendão (OR = 1,98; IC95% = 1,30–3,01) e afastamento de atividades físicas devido à dor (OR = 1,89; IC95% = 1,01–


3,53). Além disso, a análise combinada de *FcRL3* -169T>C e *FOXP3* - 2383C>T sugeriu uma interação gene-gene na suscetibilidade da tendinopatia, devido os genótipos variantes combinados *FcRL3* -169 (TC ou CC) e *FOXP3* -2383 (CT ou TT) terem sido associados ao risco aumentado da tendinopatia em atletas que apresentavam dor no tendão afetado (OR = 2,24; IC95%: 1,14-4,40 e OR = 2,60; IC95%: 1,11-6,10). Esses resultados sugerem que o polimorfismo *FcRL3* -169T>C pode estar envolvido na etiologia inflamatória da tendinopatia.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Fc receptor-like 3 (–169T>C) polymorphism increases the risk of tendinopathy in volleyball athletes: a case control study

José Inácio Salles^{1,2,4}, Lucas Rafael Lopes^{1,3,5}, Maria Eugenia Leite Duarte¹, Dylan Morrissey⁴, Marilena Bezerra Martins¹, Daniel Escorsim Machado³, João Antonio Matheus Guimarães¹ and Jamila Alessandra Perini^{1,3,5*} 

Abstract

Background: Tendinopathy pathogenesis is associated with inflammation. Regulatory T (Treg) cells contribute to early tissue repair through an anti-inflammatory action, with the forkhead box P3 (FOXP3) transcription factor being essential for Treg function, and the FC-receptor-like 3 (FCRL3) possibly negatively regulating Treg function. *FCRL3* –169T>C and *FOXP3* –2383C>T polymorphisms are located near elements that regulate respective genes expression, thus it was deemed relevant to evaluate these polymorphisms as risk factors for tendinopathy development in athletes.

Methods: This case-control study included 271 volleyball athletes (146 tendinopathy cases and 125 controls) recruited from the Brazilian Volleyball Federation. Genotyping analyses were performed using TaqMan assays, and the association of the polymorphisms with tendinopathy evaluated by multivariate logistic regression.

Results: Tendinopathy frequency was 63% patellar, 22% rotator cuff and 15% Achilles tendons respectively. Tendinopathy was more common in men (OR = 2.87; 95% CI = 1.67–4.93). Higher age (OR = 8.75; 95% CI = 4.33–17.69) and more years of volleyball practice (OR = 8.38; 95% CI = 3.56–19.73) were risk factors for tendinopathy. The *FCRL3* –169T>C frequency was significantly different between cases and controls. After adjustment for potential confounding factors, the *FCRL3* –169C polymorphism was associated with increased tendinopathy risk (OR = 1.44; 95% CI = 1.02–2.04), either considering athletes playing with tendon pain (OR = 1.98; 95% CI = 1.30–3.01) or unable to train due to pain (OR = 1.89; 95% CI = 1.01–3.53). The combined variant genotypes, *FCRL3* –169TC or –169CC and *FOXP3* –2383CT or –2383TT, were associated with an increased risk of tendinopathy among athletes with tendon pain (OR = 2.24; 95% CI: 1.14–4.40 and OR = 2.60; 95% CI: 1.11–6.10). The combined analysis of *FCRL3* –169T>C and *FOXP3* –2383C>T suggests a gene-gene interaction in the susceptibility to tendinopathy.

Conclusions: *FCRL3* –169C allele may increase the risk of developing tendinopathy, and together with knowledge of potential risk factors (age, gender and years playing) could be used to personalize elite athletes' training or treatment in combination with other approaches, with the aim of minimizing pathology development risk.

Keywords: Fc receptor-like 3, Forkhead box P3 gene, Single nucleotide polymorphism, Tendinopathy, Volleyball athletes

* Correspondence: jamilaperini@yahoo.com.br; japerini@into.saude.gov.br

¹Research Division, National Institute of Traumatology and Orthopaedics, Avenida Brasil, 500, Rio de Janeiro, RJ 20940-070, Brazil

³Research Laboratory of Pharmaceutical Sciences, West Zone State University, Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

The viscoelastic properties of tendons are fundamental for transmitting the force generated by muscle for sport performance. However, the tissue deformation during repetitive and continuous stress makes the tendons susceptible to injury [1]. High-level volleyball players have an inherently high training load and the constant repetition of technical movements may increase the risk for tendinopathy [2].

Historically, tendinopathy has been considered an inflammatory disease, nevertheless a failed healing response of the tendon is regarded as being the main disruption [3, 4]. Previous analysis of tissue samples with tendon pathologies has shown collagen fiber degeneration and disorientation, hypercellularity, angiogenesis and decrease in inflammatory cells [5–7]. In addition, further evidence has suggested that tendons submitted to repetitive mechanical stress and its damage to stromal tissues plays a critical role in the immune system response to regeneration [8]. Thus, the influx of immune cells and their subsequent cytokine production and the critical interactions with resident tenocytes were determinants of the inflammatory effect on the tendon repair or degeneration [9]. Recently, several studies with animal

models and tissue samples of tendinopathy patients have reinforced that the immune cells play a key role in the pathophysiology of this disease. [4, 10, 11]. Moreover, other studies have exposed the presence of T lymphocytes in tendinopathic tissue samples and indicated that this cell population may be more immunologically active than was previously thought [11–13].

CD4+ Foxp3+ regulatory T cells (Treg) are a subset of T lymphocytes that mediate an inhibitory effect on immune activity by suppressing the proliferation and function of effector T cells [14, 15]. The forkhead box P3 (FOXP3) is a transcription factor that plays an essential role in the function of Treg cells, in regulating the immune response and maintaining immune tolerance [16]. The FOXP3, encoded by the gene with the same name, is located in chromosome Xp11.23, and consists of 11 exons and encode a 431 amino-acid protein [17]. Polymorphisms in FOXP3 gene may interfere in the suppressive function of Treg cells, lead to immune system instability, and hence, to the development of disease [18, 19]. The FOXP3 -2383C>T (rs3761549) polymorphism is located in the first intron, close to the FOXP3 promoter region, and has been associated with susceptibility to autoimmune diseases [20–22]. These results have suggest a discussion about the Treg cell functions in relation to the pathogenic mechanisms of tendinopathy.

Since the Treg cells maintain immunological tolerance and prevent autoimmune and inflammatory diseases [14, 23], understanding of the genes involved in these pathways is essential for a better understanding

of the pathological mechanisms. In this context, Fc receptor-like 3 (FCRL3) is a glycoprotein of the immunoglobulin receptor superfamily, expressed in Treg cells that may play a role as a negative regulator of Treg function [24–26]. The FCRL3, encoded by the gene with the same name, is located in chromosome 1q21–23, and has a functional polymorphism in the promoter region (FCRL3 -169T>C, rs7528684) that changes promoter activity and consequently alters nuclear factor- κ B (NF κ B) binding [27]. Moreover, FCRL3 -169C polymorphism has been associated with higher expression of FCRL3 in Treg cells [24, 27]. Due to the importance of their signaling domains in various immune cell types, the FCRL3 gene probably modulates immune cell functions, and affects signaling pathways.

We hypothesized that polymorphisms in FCRL3 and FOXP3 genes may influence the onset and/or the progression of tendinopathy. The main aim of this study was to investigate the contribution of FCRL3 -169T>C and FOXP3 -2383C>T polymorphisms as risk factors for tendinopathy development in volleyball athletes, as well as their association with tendinopathy symptoms and sports activities.

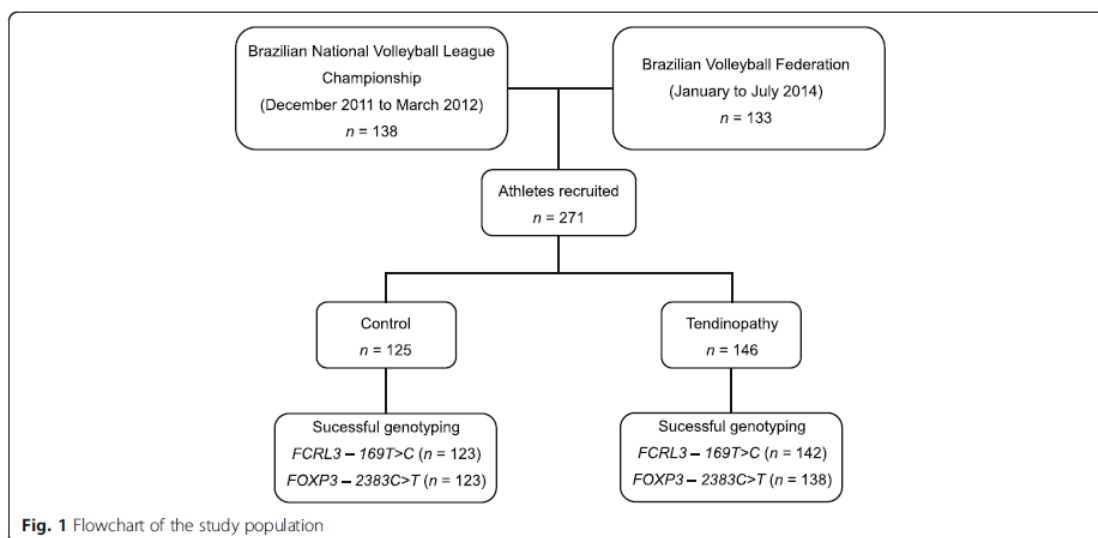
Methods

Study design

The study protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Brazilian National Institute of Traumatology and Orthopedics (Protocol number 0037.0.305.000/2011 and 17373613.8.0000.5273/2013). Two hundred and seventy one athletes recruited via the Brazilian Volleyball Federation in Rio de Janeiro, Brazil. A study flowchart (Fig. 1) describes the athlete recruitment period (tendinopathy cases and controls), and the number of samples successfully genotyped for each polymorphism.

Inclusion criteria were volleyball players from the Brazilian Volleyball Federation. All participating athletes or their parents/legal guardians provided written informed consent and answered a questionnaire detailing demographics, sports activities, medical history, personal tendon injury and painful symptoms. The questionnaires were personally administered in two periods, December 2011–March 2012 and January 2014–July 2014, during training and the competition. The questionnaires included questions about ethnicity, self-identified according to the classification scheme adopted by the Brazilian Census (<http://www.ibge.gov.br>), which relies on self-perception of skin color. Accordingly, individuals were distributed in three “race/color” groups: *branco* (white, $n = 103$), *pardo* (meaning brown, here denoted as intermediate, $n = 7$), and *preto* (black, $n = 22$). One hundred thirty-nine athletes (51.3%) declined to give information about ethnicity.

The athletes were separated into cases ($n = 146$) and controls ($n = 125$) group (Fig. 1), according the presence



or absence of tendinopathy clinically diagnosed by medical practitioners and confirmed with magnetic resonance image examination (MRI). The confirmatory MRI was performed during the Volleyball National Championship (December 2011 to March 2012) and the training of Brazilian Volleyball Federation carried out from January through July 2014. All diagnoses were confirmed by two blinded radiologists. As described in our previous studies [28, 29], the chronic tendinopathy diagnostic were (i) progressive pain related to training in the last 6 months and during clinical examination; and at least one of the following criteria: (ii) palpable nodular thickening over the tendon; (iii) tenderness on tendon palpation; (iv) history of swelling over the tendon area. The control group consisted of athletes with absence of tendinopathy history in any joint and who present no previous diagnosis of tendinopathy.

Genotyping of polymorphisms

Genomic DNA was obtained from saliva samples as previously described [28]. The genotyping analyses of *FCRL3* -169T>C (rs7528684) and *FOXP3* -2383C>T (rs3761549) polymorphisms were performed using a TaqMan allelic discrimination assay obtained from Applied

Biosystems (C_1741825_10 and C_27058744_10, respectively). For all polymorphisms real-time polymerase chain reaction (PCR) reactions were performed on a 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the genotypes were then determined directly.

Statistical analysis

The sample size was calculated using Epi Info 7, version 7.1.3. (<http://www.cdc.gov/epiinfo/html/downloads.htm>)

to detect a difference between case and control groups, assuming an odds ratio of 2.0 with a power of 0.8 and 5% type I error.

The Student's *t*-test was conducted to compare continuous variables between tendinopathy cases and controls and were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Chi-square (χ^2) test or Fisher's exact test, when applicable, was applied to compare differences in nominal data, as well as for the statistical analysis of the distribution frequencies of genotypes and alleles between the two groups. Additionally, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated by the χ^2 test for goodness-of-fit. *FCRL3* -169T>C and *FOXP3* -2383C>T allele frequency and genotype distribution were derived by gene counting.

Multivariate logistic regression analyses were performed to identify possible confounding factors in the associations between polymorphisms and tendinopathy or between polymorphisms and tendinopathy features, which was estimated by the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI). The difference was statistically significant when $p < 0.05$. All analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), version 20.0.

Results

Table 1 presents the demographic, clinical and sport characteristics of the volleyball athletes. There were significant differences between the tendinopathy cases and controls with regard to mean age (26.86 ± 6.03 and 21.62 ± 5.39 , respectively, $p = 0.0001$), average time of years of practice in volleyball (12.27 ± 5.35 and 8.27 ± 4.92 , respectively, $p = 0.0001$), gender and tendinopathy clinical symptoms (tendon pain and away from training due pain).

Table 1 Characteristics of the volleyball athletes ($n = 271$)

Variables	Controls ($n = 125$)	Tendinopathy ($n = 146$)	p -value ^a	OR (95% CI)
Age group	n (%)			
Sub - 18	47 (37.6)	14 (9.6)	< 0.001	1 ^b
Sub - 23	40 (32.0)	33 (22.6)		2.77 (1.30–5.89)
Adult	38 (30.4)	99 (67.8)		8.75 (4.33–17.69)
Gender				
Female	52 (41.6)	29 (19.9)	< 0.001	1 ^b
Male	73 (58.4)	117 (80.1)		2.87 (1.67–4.93)
Ethnicity ^c				
White	67 (74.4)	36 (85.7)	0.41	1 ^b
Intermediate	5 (5.6)	2 (4.8)		0.74 (0.14–4.03)
Black	18 (20.0)	4 (9.5)		0.41 (0.13–1.31)
Years of practice in volleyball				
0–5	45 (36.0)	17 (11.6)	< 0.001	1 ^b
6–10	46 (36.8)	40 (27.4)		2.30 (1.14–4.64)
11–15	22 (17.6)	51 (34.9)		6.14 (2.90–12.98)
> 15	12 (9.6)	38 (26.1)		8.38 (3.56–19.73)
Declared preference				
Right	120 (96.0)	141 (96.6)	0.53	1 ^b
Left	5 (4.0)	5 (3.4)		0.85 (0.24–3.01)
Function				
Spiker	90 (72.0)	115 (78.8)	0.34	1 ^b
Setter	22 (17.6)	22 (15.1)		0.78 (0.41–1.50)
Libero	13 (10.4)	9 (6.1)		0.54 (0.22–1.32)
Traumatic lesion				
No	85 (68.0)	88 (60.3)	0.23	1 ^b
Yes	40 (32.0)	58 (39.7)		1.40 (0.85–2.31)
Tendon pain				
No	47 (37.6)	14 (9.6)	< 0.001	1 ^b
Yes	78 (62.4)	132 (90.4)		5.68 (2.94–10.98)
Away from training due pain				
No	91 (72.8)	80 (54.8)	0.003	1 ^b
Yes	34 (27.2)	66 (45.2)		2.21 (1.32–3.68)

Notes: OR odds ratio; CI confidence interval

^aChi-Square Test or Fisher's exact test^bReference group^cThere are ethnicity information of 132 athletes

The evaluation of demographic and clinical characteristics revealed the athlete male gender (moderate risk), older age and higher years of practice in volleyball (very large risk) were risk factors for tendinopathy (Table 1). However, there were no significant differences between the two groups concerning the average time of practice in volleyball by age group (Student T test, Fig. 2a). The frequency of tendinopathy by tendon among elite volleyball athletes is shown in Fig. 2b. There was a significant

gender difference among to the affected tendon type ($p = 0.003$, χ^2 test).

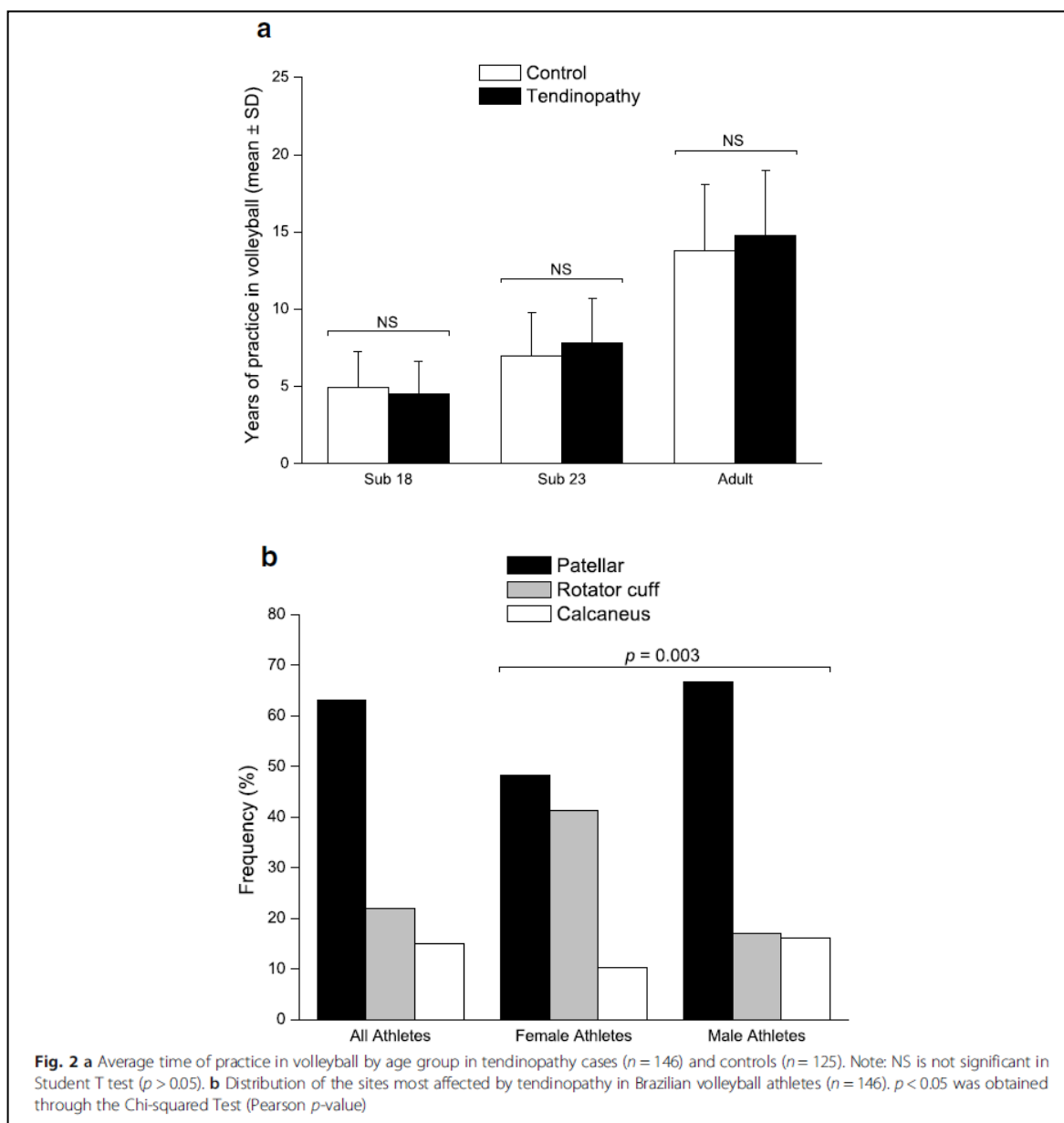
The *FCRL3* $-169T>C$ and *FOXP3* $-2383C>T$ polymorphisms were in Hardy–Weinberg equilibrium. The allelic and genotypic frequencies and association's analyses of both polymorphisms are summarized in Table 2. Athletes with tendinopathy showed a significant higher frequency of the variant allele *FCRL3* $-169C$ compared with the controls. After adjusting for confounding factors (age, years of practice in volleyball, gender and pain), evaluated in multivariate logistic regression models, *FCRL3* $-169C$ polymorphism was associated with a higher risk of tendinopathy. By contrast, no significant differences were detected in the *FOXP3* $-2383C>T$ polymorphism frequency between the two groups (Table 2). In addition, *FCRL3* $-169T>C$ polymorphism frequency was significantly different regards to tendon pain and were away from training due pain between cases and controls who presented these clinical symptoms complaints (Table 3). After adjusting for confounding factors, the *FCRL3* $-169C$ allele increases the risk (approximate 2-fold) of developing tendinopathy among athletes who present pain or were away from training due pain. Moreover, a combined analysis of the *FCRL3* $-169T>C$ and *FOXP3* $-2383C>T$ polymorphisms was performed to investigate if their inter-

action would increase the risk of developing of tendinopathy among athletes who present tendon pain or were away from training due pain (Fig. 3). It has been observed that relative to the combined wild-type genotype (*FCRL3* $-169TT$ and *FOXP3* $-2383CC$), the combined variant genotype (*FCRL3* $-169TC$ or $-169CC$ and *FOXP3* $-2383CT$ or $-2383TT$) were associated with an increased risk of developing tendinopathy among athletes who present tendon pain (WT/VAR: OR = 2.24; 95% CI: 1.14–4.40 and VAR/VAR: OR = 2.60; 95% CI: 1.11–6.10) or were away from training due pain (VAR/VAR: OR = 5.00; 95% CI: 1.12–22.30).

Based on the results of this study and the previous ones, we propose a hypothesis for the role of *FCRL3* $-169T>C$ polymorphism in the tendinopathy development (Fig. 4).

Discussion

High incidence of tendon overuse injuries prevails in elite volleyball athletes mainly because they have to go through many hours of practice [2]. Moreover, the biomechanical characteristics of the skills required in volleyball associated with the joint anatomy of the players are accepted as being the risk factors for overuse injuries [30]. Among the ball-related sports, volleyball is one of the types that cause a high rate of overuse injury by demanding repetition of similar movement patterns [31] with an professional volleyball attacker performing approximately 40,000 spikes a year [32]. This volume of spikes may be represented by the fact that from 8 to



20% of the injuries occurring in the shoulder [33] and nearly 45% of injuries in volleyball athletes are identified as patellar tendinopathy [34, 35]. In present study, tendinopathy in Brazilian volleyball athletes was more frequent in the knee (63% patellar) followed by the shoulder (22%). Moreover, female athletes presented a higher frequency of tendinopathy in the shoulder (41% in female versus 17% in male), corroborating the findings of a study unrelated to sport that the female gender was a risk factor for the

development of rotator cuff disease [36]. Furthermore, Reiser and colleagues investigated risk factors for volleyball-related shoulder pain and dysfunction, and observed that female players showed lower simple shoulder test scores than male athletes [33].

Repetitive and strong physical activity, characteristic of elite athletes, contributes to excessive loading of tendons, promoting inflammation and pathological degeneration [4, 37]. Despite the development of physical

Table 2 Association analyses of the *FCRL3* -169T>C and *FOXP3* -2383C>T polymorphisms in tendinopathy cases compared with controls

SNP	Controls n (%)	Tendinopathy n (%)	p-value ^a	OR (95% CI) ^b
<i>FCRL3</i> -169T>C				
TT	48 (39.0)	40 (28.2)		1 ^c
TC	56 (45.6)	70 (49.3)	0.19	1.50 (0.86–2.59)
CC	19 (15.4)	32 (22.5)	0.04	2.02 (0.10–4.09)
TC + CC	75 (61.0)	102 (71.8)	0.08	1.63 (0.97–2.73)
T	152 (61.8)	150 (52.8)	0.04	1 ^c
C	94 (38.2)	134 (47.2)		1.44 (1.02–2.04)
<i>FOXP3</i> -2383C>T				
CC	86 (69.9)	97 (70.3)		1 ^c
CT	30 (24.4)	37 (26.8)	0.86	1.09 (0.62–1.92)
TT	7 (5.7)	4 (2.9)	0.45	0.51 (0.14–1.79)
CT + TT	37 (30.1)	41 (29.7)	1.0	0.98 (0.58–1.67)
C	202 (82.1)	231 (83.7)	0.71	1 ^c
T	44 (17.9)	45 (16.3)		0.89 (0.57–1.41)

Note: SNP single nucleotide polymorphism, OR odds ratio, CI confidence interval
^aChi-Square Test or Fisher's exact test

^bAdjusted by age, years of practice in volleyball, gender and pain

^cReference group

qualities in high performance teams to reduce the tendinopathy risk, no standard that sufficiently compensates for the demands of the training has yet been established. Therefore, considering the high costs involved with overuse injuries in athletes, new strategies should be considered for the prevention of these injuries. Recently, studies based on identifying the DNA polymorphisms have been relevant in sports medicine investigation with the purpose of identifying the athletes most likely to develop lesions and thus suggesting individualized training to improve performance in sports [28, 29, 38–42].

As far as we know, the present study is the first study to focus on the possible contribution of the *FCRL3* -169T>C and *FOXP3* -2383C>T polymorphisms to the susceptibility to tendinopathy in elite athletes. The *FCRL3* -169T>C polymorphism was associated with increased tendinopathy risk, either considering all cases, only athletes with tendon pain or those who were away from training due to pain. The *FCRL3* -169T>C polymorphism changes promoter activity and consequently alters NFκB binding [27]. Therefore, the *FCRL3* -169T>C polymorphism has previously been reported in association with rheumatoid arthritis [27, 43, 44], psoriasis vulgaris [22], neuromyelitis optica [45], multiple sclerosis [46] and endometriosis [21, 47]. Furthermore, in present study the combined

Table 3 Analysis of *FCRL3* -169 T> C polymorphism frequency with regards to tendon pain and athletes who were away from training due pain in cases compared with controls

<i>FCRL3</i> -169T>C	Controls n (%)	Tendinopathy n (%)	p-value ^a	OR (95% CI)
Tendon pain ^b				
	(n = 77)	(n = 128)		
TT	38 (49.3)	34 (26.6)		1 ^d
TC	29 (37.7)	65 (50.8)	0.007	2.5 (1.32–4.74)
CC	10 (13.0)	29 (22.6)	0.010	3.24 (1.38–7.62)
TC + CC	39 (50.7)	94 (73.4)	0.002	2.69 (1.49–4.88)
T	105 (68.2)	133 (51.9)	0.002	1 ^d
C	49 (31.8)	123 (48.1)		1.98 (1.30–3.01)
Away from training due pain ^c				
	(n = 33)	(n = 63)		
TT	15 (45.5)	15 (23.8)		1 ^d
TC	15 (45.5)	37 (58.7)	0.09	2.47 (0.97–6.28)
CC	3 (9.0)	11 (17.5)	0.14	3.66 (0.85–15.90)
TC + CC	18 (54.5)	48 (76.2)	0.05	2.67 (1.09–6.54)
T	45 (68.2)	67 (53.2)	0.03	1 ^d
C	21 (31.8)	59 (46.8)		1.89 (1.01–3.53)

Differences in sample sizes are due to available data from PCR amplification for each polymorphism

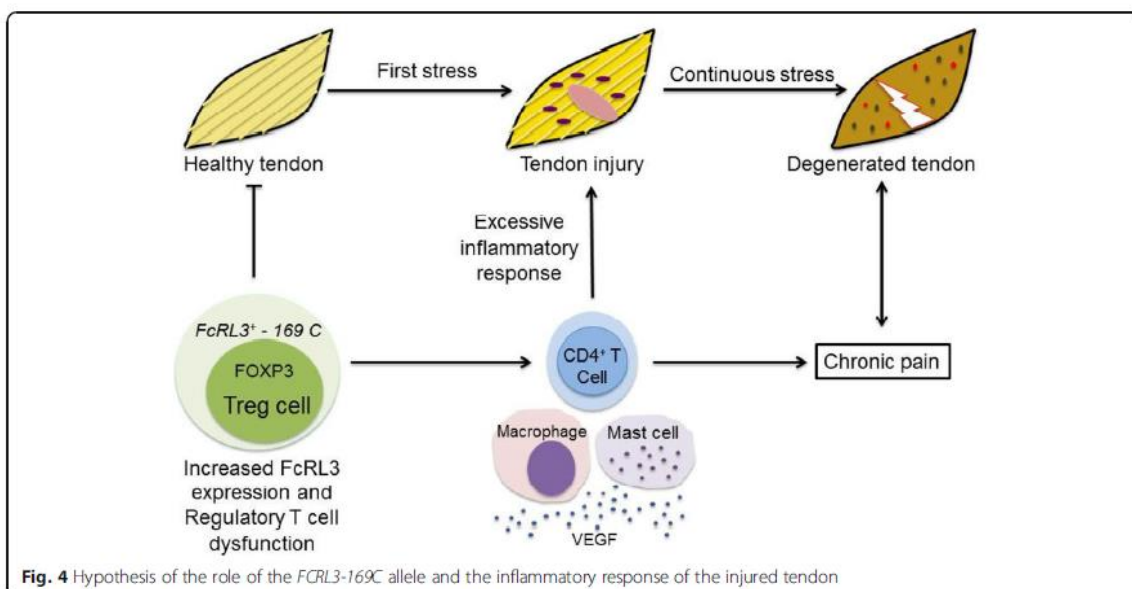
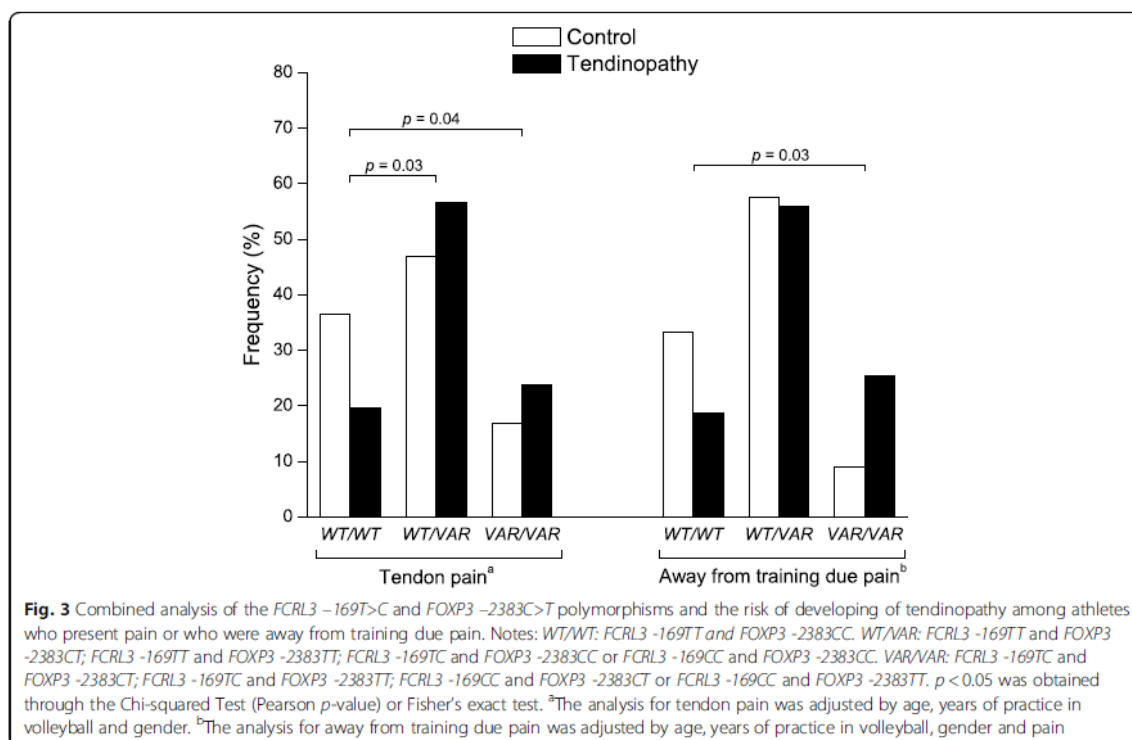
Note: OR odds ratio, CI confidence interval

^aChi-Squared Test or Fisher's exact test

^bThe analysis for tendon pain was adjusted by age, years of practice in volleyball and gender

^cThe analysis for away from training due pain was adjusted by age, years of practice in volleyball, gender and pain

^dReference group



variant genotypes of *FCRL3* -169T>C and *FOXP3* -2383C>T were also associated with an increased risk for developing tendinopathy among athletes who presented tendon pain or were away from training due to pain. The combined analysis of *FCRL3* -169T>C and *FOXP3* -2383C>T suggested a gene-gene interaction in the susceptibility to tendinopathy. The cumulative effect of interaction of *FCRL3* -169T>C and *FOXP3* -2383C>T polymorphisms has previously been demonstrated in the development of endometriosis [47]. The *FOXP3* -2383C>T polymorphism may interfere in the *FOXP3* factor, promoting Treg cell dysfunction and development of diseases [48].

In the early stages of tendinopathy, changes in tissue microenvironment and activation of the innate immune system contribute to inflammatory repair in tendons [4]. In an experimental animal model of chronic tendinopathy, mast cells and macrophages were recruited and released angiogenic growth factors, which stimulate the proliferation of new blood vessels [49]. Interestingly, the major angiogenic growth factor VEGF is not found in healthy tendons [50], but it is expressed in tendons in chronic degeneration [51]. Recently, our group investigated whether polymorphisms in *VEGF* and its receptor *KDR* genes could be correlated with susceptibility to tendinopathy. We described evidences that the polymorphisms in *KDR* might alter receptor activity, influence the angiogenic process and consequently contribute to inter-individual variation in the development of tendinopathy in volleyball athletes [29].

In addition to the recruitment of macrophages and mast cells, and increase in angiogenesis signals in the tendon injury microenvironment, the CD4+ T cell also migrated into tissue and released pro-inflammatory cytokines, including interleukin 2 (IL-2), enhancing the innate immune response for tendon repair [11]. However, the persistence of stimuli in the tendon over a long period may cause tissue degeneration by excessive inflammatory responses and lead to chronic pain [37]. In this context, we suggest that CD4+ Foxp3+ regulatory T cells (Treg) could modulate the function of effector T cells during tendon repair by regulating the expression of target genes in the inflammatory response. As already described in other pathological conditions, polymorphisms can modulate the function of Tregs, harming the immune response [24, 52]. In present study, we found that *FCRL3* -169C allele was associated with increased tendinopathy risk. This allele increased *FCRL3* gene expression in Treg cells and promoted inflammatory response to a greater extent in by the CD4+ T cell generating higher levels of immune activation [24]. Thus, we proposed a hypothesis relative to the role of the *FCRL3* -169C allele in Treg cell dysfunction preventing the tendon regeneration (Fig. 4).

The main limitation of this approach was that the present study did not collect information on ethnicity of all athletes. The high degree of admixture of different ethnic backgrounds (mostly Europeans, Africans and Amerindians) in the Brazilian population, poses special challenges to ethnic classification. The Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) responsible for the official census of Brazil, has used only few pre-established color categories, which are based on self-classification (see **Methods**). However, there is poor correlation of self-reported race/color with genetic ancestry among Brazilians and this is based on a complex subjective phenotypic evaluation [53]. Therefore, it was not possible to apply adjustments for population stratification [54], in spite of no significant difference in ethnicity being observed between the tendinopathy athletes and the control group. The extrapolation of genetic data obtained from well-defined ethnic groups is not appropriate for application to Brazilians [53] and our data can be used in future studies to improve understanding of the risk factors involved in the development of tendinopathy in athletes.

Finally, our group has been developing studies with the purpose of identifying genetic characteristics that may clarify new therapeutic targets or personalized training programs to treat the disease or to avoid the development of tendinopathy in athletes. However, the information about magnitude of each variable is necessary to determine if the effect has an important role in practical and clinical decisions about applicability of the outcome [55]. In this study, *FCRL3* and *FOXP3* polymorphisms and male gender were associated with a moderate risk (approximate 2-fold), whereas athlete older age and higher years of practice in volleyball were associated with a higher risk (approximate 8-fold) of tendinopathy. The knowledge of the potential risk factors associated with tendinopathy may help to build models to use for diagnosing athletes susceptible to tendon injury and providing these athletes with additional personalized support.

Conclusion

The cumulative effect of *FCRL3* -169T>C and *FOXP3* -2383C>T polymorphisms was associated with development of tendinopathy in Brazilian volleyball athletes, and this genetic knowledge together potential risk factors (age, gender and years of practice in volleyball) could improve the personalized training or treatment of athletes.

Abbreviations

95% CI: 95% Confidence interval; *FCRL3*: FC-receptor-like 3; *FOXP3*: Forkhead box P3; HWE: Hardy-Weinberg equilibrium; IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; IL2: Interleukin 2; *KDR*: Kinase insert domain receptor; MRI: Magnetic resonance image examination; NFκB: Nuclear factor-κB; OR: Odds ratios; PCR: Polymerase chain reaction; SD: Standard deviation; SNPs: Single nucleotide polymorphisms; Treg: Regulator T cells; VAR: Variant; VEGF: Vascular endothelial growth factor; WT: Wild-type; χ²: Chi-square

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding authors on reasonable request.

Authors' contributions

JAP participated in conception and design of study. JIS and MBM collated the data and developed the database. LRL and JAP helped to experiments. LRL, DEM and JAP analysis, interpretation of data and wrote the manuscript. JMG, DM and MELD critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the National Institute of Traumatology and Orthopedics, Rio de Janeiro, Brazil. All participating or their parents/legal guardians provided written informed consent.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Research Division, National Institute of Traumatology and Orthopaedics, Avenida Brasil, 500, Rio de Janeiro, RJ 20940-070, Brazil. ²Federation International de Volleyball (FIVB) - Coach Commission, Rio de Janeiro, Brazil. ³Research Laboratory of Pharmaceutical Sciences, West Zone State University, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Centre for Sports Exercise Medicine, Queen Mary University of London, London, UK. ⁵Program of Post-graduation in Public Health and Environment, National School of Public Health, Oswald Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 21 September 2017 Accepted: 26 June 2018

Published online: 18 July 2018

References

- van der Worp H, van Ark M, Roerink S, Pepping GJ, van den Akker-Scheek I, Zwerver J. Risk factors for patellar tendinopathy: a systematic review of the literature. *Br J Sports Med*. 2011;45(5):446–52.
- Eerkes K. Volleyball injuries. *Curr Sports Med Rep*. 2012;11(5):251–6.
- Rees J, Maffulli N, Cook J. Management of tendinopathy. *Am J Sports Med*. 2009;37:1855–67.
- Millar NL, Murrell GAC, McInnes IB. Inflammatory mechanisms in tendinopathy – towards translation. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(2):110–22.
- Astrom M, Rausing A. Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. *Clin Orthop Relat Res*. 1995;316:151–64.
- Khan KM, Maffulli N. Tendinopathy: an Achilles' heel for athletes and clinicians. *Clin J Sport Med*. 1998;8(3):151–4.
- Jelinsky SA, Rodeo SA, Li J, Gulotta LV, Archambault JM, Seeherman HJ. Regulation of gene expression in human tendinopathy. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:86.
- Lories RJ, McInnes IB. Primed for inflammation: enthesis-resident T cells. *Nat Med*. 2012;18(7):1018–9.
- Marsolais D, Cote CH, Frenette J. Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. *J Orthop Res*. 2001;19(6):1203–9.
- Dean BJ, Gettings P, Dakin SG, Carr AJ. Are inflammatory cells increased in painful human tendinopathy? A systematic review. *Br J Sports Med*. 2016;50(4):216–20.
- Millar NL, Hueber AJ, Reilly JH, Xu Y, Fazzi UG, Murrell GA, et al. Inflammation is present in early human tendinopathy. *Am J Sports Med*. 2010;38(10):2085–91.
- Kragsnaes MS, Fredberg U, Stribolt K, Kjaer SG, Bendix K, Ellingsen T. Stereological quantification of immune-competent cells in baseline biopsy specimens from achilles tendons: results from patients with chronic tendinopathy followed for more than 4 years. *Am J Sports Med*. 2014;42(10):2435–45.
- Schubert TE, Weidler C, Lerch K, Hofstadter F, Straub RH. Achilles tendinosis is associated with sprouting of substance P positive nerve fibres. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(7):1083–6.
- Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev*. 2008;223:371–90.
- Oh S, Rankin AL, Caton AJ. CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune arthritis. *Immunol Rev*. 2010;233:97–111.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudenski AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4:330–6.
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001;27(1):68–73.
- Oda JM, Hirata BK, Guembarovski RL, Watanabe MA. Genetic polymorphism in FOXP3 gene: imbalance in regulatory T-cell role and development of human diseases. *J Genet*. 2013;92(1):163–71.
- Jiang LL, Ruan LW. Association between FOXP3 promoter polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *Oncol Lett*. 2014;8(6):2795–9.
- Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet*. 2007;39(11):1329–37.
- Bianco B, Teles JS, Lerner TG, Vilarino FL, Christofolini DM, Barbosa CP. Association of FCRL3 -169T/C polymorphism with endometriosis and identification of a protective haplotype against the development of the disease in Brazilian population. *Hum Immunol*. 2011;72(9):774–8.
- Song QH, Shen Z, Xing XJ, Yin R, Wu YZ, You Y, et al. An association study of single nucleotide polymorphisms of the FOXP3 intron-1 and the risk of psoriasis vulgaris. *Indian J Biochem Biophys*. 2012;49(1):25–35.
- Bajpai UD, Swainson LA, Mold JE, Graf JD, Imboden JB, McCune JM. A functional variant in FCRL3 is associated with higher FCRL3 expression on T cell subsets and rheumatoid arthritis disease activity. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2451–9.
- Swainson LA, Mold JE, Bajpai UD, McCune JM. Expression of the autoimmune susceptibility gene FCRL3 on human regulatory T cells is associated with dysfunction and high levels of programmed cell death-1. *J Immunol*. 2010;184(7):3639–47.
- Chistiakov DA, Chistiakov AP. Is FCRL3 a new general autoimmunity gene? *Hum Immunol*. 2007;68:375–83.
- Nagata S, Ise T, Pastan I. Fc receptor-like 3 protein expressed on IL-2 nonresponsive subset of human regulatory T cells. *J Immunol*. 2009;182(12):7518–26.
- Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, et al. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet*. 2005;37(5):478–85.
- 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;18(2):150–5.
- Salles JI, Duarte ME, Guimarães JM, Lopes LR, Vilarinho Cardoso J, Aguiar DP, et al. Vascular endothelial growth factor Receptor-2 polymorphisms have protective effect against the development of tendinopathy in volleyball athletes. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167717.
- Seminati E, Minetti AE. Overuse in volleyball training/practice: review on shoulder and spine-related injuries. *Eur J Sport Sci*. 2013;13(6):732–43.
- Chan KM, Yuan Y, Li CK, Chien P, Tsang G. Sports causing most injuries in Hong Kong. *Br J Sports Med*. 1993;27(4):263–7.
- Chaloumas D, Artemiou A, Dimitrakakis G. Dominant vs. non-dominant shoulder morphology in volleyball players and associations with shoulder pain and spike speed. *J Sports Sci*. 2017;35(1):65–73.
- Reeser JC, Joy EA, Porucznik CA, Berg RL, Colliver EB, Willick SE. Risk factors for volleyball-related shoulder pain and dysfunction. *PM R*. 2010;2(1):27–36.
- Lian OB, Engebretsen L, Bahr R. Prevalence of jumper's knee among elite athletes from different sports: a cross-sectional study. *Am J Sports Med*. 2005;33(4):561–7.
- Zwerver J, Bredeweg SW, van den Akker-Scheek I. Prevalence of Jumper's knee among nonelite athletes from different sports: a cross-sectional survey. *Am J Sports Med*. 2011;39(9):1984–8.
- Motta Gda R, Amaral MV, Rezende E, Pitta R, Vieira TC, Duarte ME, et al. Evidence of genetic variations associated with rotator cuff disease. *J Shoulder Elb Surg*. 2014;23(2):227–35.

37. Browne GJ, Barnett PLJ. Common sports-related musculoskeletal injuries presenting to the emergency department. *J Paediatr Child Health*. 2016; 52(2):231–6.
38. Maffulli N, Margiotti K, Longo UG, Loppini M, Fazio VM, Denaro V. The genetics of sports injuries and athletic performance. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2013;3(3):173–89.
39. 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;14:221.
40. Cauci S, Migliozi F, Trombetta CS, Venuto I, Saccheri P, Travan L, et al. Low back pain and FokI (rs2228570) polymorphism of vitamin D receptor in athletes. *BMC Sports Sci Med Rehabil*. 2017;9:4.
41. Li YC, Wang LQ, Yi LY, Liu JH, Hu Y, Lu YF, et al. ACTN3 R577X genotype and performance of elite middle-long distance swimmers in China. *Biol Sport*. 2017;34(1):39–43.
42. Onysiak J, Mazur-Różycka J, Busko K, Gajewski J, Szczepanska B, Malczewska-Lenczowska J. Individual and combined influence of ACE and ACTN3 genes on muscle phenotypes in Polish athletes. *J Strength Cond Res*. 2017; <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000001839>.
43. Maehlen MT, Nordang GB, Syversen SW, van der Heijde DM, Kvien TK, Uhlig T, et al. FCRL3 -169C/C genotype is associated with anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis and with radiographic progression. *J Rheumatol*. 2011;38(11):2329–35.
44. Lin X, Zhang Y, Chen Q. FCRL3 gene polymorphisms as risk factors for rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 2016;77(2):223–9.
45. Lan W, Fang S, Zhang H, Wang DT, Wu J. The Fc receptor-like 3 polymorphisms (rs7528684, rs945635, rs3761959 and rs2282284) and the risk of Neuromyelitis Optica in a Chinese population. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(38):e1320.
46. Yuan M, Wei L, Zhou R, Bai Q, Wei Y, Zhang W, et al. Four FCRL3 gene polymorphisms (FCRL3_3, _5, _6, _8) confer susceptibility to multiple sclerosis: results from a case-control study. *Mol Neurobiol*. 2016;53(3):2029–35.
47. Barbosa CP, Teles JS, Lerner TG, Peluso C, Mafra FA, Vilarino FL, et al. Genetic association study of polymorphisms FOXP3 and FCRL3 in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2012;97(5):1124–8.
48. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet*. 2002;39(8):537–45.
49. de Oliveira RR, Martins CS, Rocha YR, Braga AB, Mattos RM, Hecht F, et al. Experimental diabetes induces structural, inflammatory and vascular changes of Achilles tendons. *PLoS One*. 2013;8(10):e74942.
50. Karsten K. The role of tendon microcirculation in Achilles and patellar tendinopathy. *J Orthop Surg Res*. 2008;3:18.
51. Nakama LH, King KB, Abrahamsson S, Rempel DM. VEGF, VEGFR-1, and CTGF cell densities in tendon are increased with cyclical loading: an in vivo tendinopathy model. *J Orthop Res*. 2006;24(3):393–400.
52. Ben Jmaa M, Abida O, Bahloul E, Toumi A, Khelif S, Fakhfakh R, et al. Role of FOXP3 gene polymorphism in the susceptibility to Tunisian endemic pemphigus Foliaceus. *Immunol Lett*. 2017;184:105–11.
53. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. 2011;6(2):e17063.
54. Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet*. 2006;38(8):904–9.
55. Hopkins WG. Linear models and effect magnitudes for research, clinical, and practical applications. *Sports Science*. 2010;14(1):49–58.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



6.2 POLIMORFISMOS DO GENE *FATOR DE NECROSE TUMORAL TIPO ALFA (TNF- α)* AUMENTAM O RISCO DE TENDINOPATIA EM ATLETAS: UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE

Neste trabalho foi investigada a influência dos polimorfismos do gene *TNF- α* (-1031 T>C, -857C>T, -308 G>A) atuando no desenvolvimento da tendinopatia. A população do estudo foi composta de 135 casos de tendinopatia e 135 controles pareados aos casos, conforme mencionado no item 5.2.2.

A frequência dos locais acometidos pela doença foi de 38,4% no tendão patelar, 29,9% do manguito rotador, 14,1% Aquiles, 9,1% das mãos, 7,9% epicôndilos e 0,6% no tendão do abdômen. Na análise das características epidemiológica, os atletas com índice de massa corporal ≥ 30 Kg/m² e que realizaram acompanhamento nutricional apresentaram associação de risco para tendinopatia (OR = 3,65; IC95% = 1,20 - 11,16 e OR = 2,31; IC95% = 1,40 - 3,80, respectivamente). Na análise dos polimorfismos, a distribuição genotípica de *TNF- α* -308G>A foi significativamente diferente no modelo de codominância recessiva (*TNF- α* -308GG + GA versus AA) entre casos e controles, na qual o genótipo variante *TNF- α* -308AA foi encontrado apenas em casos de tendinopatia. Após o ajuste para possíveis fatores de confundimento, o haplótipo TCA formado pelos polimorfismos *TNF- α* (-1031T> C, -857C> T e -308G> A) foi associado positivamente com a tendinopatia (OR: 2,65, IC 95%: 1,32 - 5,30). Esses dados fornecem evidências da influência de polimorfismos da região promotora de *TNF- α* atuando no desenvolvimento da tendinopatia.

Manuscript Details

Manuscript number	JSAMS_2020_299
Title	Tumor necrosis factor alpha polymorphisms increases the risk of tendinopathy in athletes: a case-control study
Article type	Original article

Abstract

Objective: To evaluate the influence of TNF- α SNPs with tendinopathy susceptibility in athletes. **Design:** Case-control study. **Methods:** A total of 270 athletes (135 tendinopathy cases and 135 matched controls by age, sex, sport modality and training / competition locations) were included in this study, and the genotyping of the TNF- α SNPs (-1031T>C; -857C>T; -308G>A) was performed using TaqMan validated assays. The association of the SNPs, epidemiological, clinical, sports and training profiles of athletes with tendinopathy were evaluated by a multivariate logistic regression model, using odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI). **Results:** The athletes with body mass index greater than or equal to 30 Kg/m² and had nutritional follow-up were positively risk for the tendinopathy (OR = 3.7; 95% CI = 1.2 – 11.2 and OR = 2.3; 95% CI = 1.4 – 3.8, respectively). The allelic frequency of the TNF- α SNPs were -1031C 24.1% and 25.9%, -857T 8.1% and 9.3%, -308A 10.0% and 15.2% in controls and tendinopathy cases, respectively. After adjustment for confounding factors, the genotypes TNF- α -308G>A distribution was significantly different between cases and controls, besides variant genotype TNF- α -308AA was present only in athletes with tendinopathy. In addition, TNF- α (-1031T>C, -857C>T and -308G>A) haplotype TCA was associated with increased tendinopathy risk (OR: 2.65, 95% CI: 1.32 – 5.30). **Conclusion:** The TNF- α SNPs, high BMI and nutritional follow-up were positively associated with tendinopathy (risk approximate 3-fold). This finding may contribute to creating sports injury surveillance programmes using genetic information aim reduce cases of the illness.

Keywords	tendinopathy, polymorphism, TNF- α , athletes
Taxonomy	Injury Epidemiology, Sports Medicine
Corresponding Author	Jamila Perini
Corresponding Author's Institution	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
Order of Authors	Lucas Rafael Lopes, Rodrigo Araújo Goes, Vitor Almeida Ribeiro Almeida Ribeiro de Miranda, João Alves Grangeiro Neto, Victor Soares Wainchtock, Camilí Gomes Pereira, João Antonio Matheus Guimarães, Daniel Escorsim Machado, Jamila Perini
Suggested reviewers	Robert McCormack, Eva Skillgate, Jeremy Witchalls

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover Letter - Journal of Science and Medicine in Sport.docx [Cover Letter]

Title page.docx [Title Page (with Author Details)]

Manuscript TNF and Tendinopathy.docx [Manuscript (without Author Details)]

Acknowledgments.docx [Acknowledgement]

Fig. 1.pdf [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:
Data will be made available on request

Rio de Janeiro, March 25, 2020.

To Editor-in-Chief of Journal of Science and Medicine in Sport
Gordon Waddington, PhD

Dear Editor,

Please find enclosed the original and our new research article entitled "Tumor necrosis factor alpha polymorphisms increases the risk of tendinopathy in athletes: a case-control study" for consideration by the *Journal of Science and Medicine in Sport* for publication purposes.

Inflammatory mechanism is involved in early stages of tendinopathies, which the high level of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) cause apoptosis and pro-inflammatory effects for primary degeneration of tendon. In addition, it's know that single nucleotide polymorphisms (SNPs) could be modulated TNF- α expression and/or function. Thus, the aim of this case-control study was to evaluate the influence of the TNF- α SNPs (-1031T>C; -857C>T; -308G>A) with tendinopathy susceptibility in athletes. A total of 270 athletes (135 tendinopathy cases and 135 controls) were included in this study, and analysis of the SNPs, epidemiological, clinical, sports and training profiles of athletes with tendinopathy were evaluated by a multivariate logistic regression model. Our results indicate that the TNF- α SNPs, high BMI and nutritional follow-up were associated an approximate 3-fold increased risk for athletes with tendinopathy. This finding can be used in future studies to better understand the influence of genetic factors in the tendinopathy susceptibility and contribute to create sports injury surveillance programmes using genetic information aim reduce cases of the illness in athletes.

We state that our manuscript was reviewed by a professional science editor and by a native English-speaking copy editor to improve readability, has not been published, submitted, or is not been submitted elsewhere for publication.

We hope that this manuscript can be accepted for publication in *Journal of Science and Medicine in Sport*.

We look forward to hearing from you. Best regards,



Dra. Jamila Alessandra Perini

Research Division, *Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia* (INTO).

Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: jamilaperini@yahoo.com.br and japerini@into.saude.gov.br

Tumor necrosis factor alpha polymorphisms increases the risk of tendinopathy in athletes: a case-control study

Abstract

Objective: To evaluate the influence of *TNF- α* SNPs with tendinopathy susceptibility in athletes.

Design: Case-control study.

Methods: A total of 270 athletes (135 tendinopathy cases and 135 matched controls by age, sex, sport modality and training / competition locations) were included in this study, and the genotyping of the *TNF- α* SNPs (*-1031T>C*; *-857C>T*; *-308G>A*) was performed using TaqMan validated assays. The association of the SNPs, epidemiological, clinical, sports and training profiles of athletes with tendinopathy were evaluated by a multivariate logistic regression model, using odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI).

Results: The athletes with body mass index greater than or equal to 30 Kg/m² and had nutritional follow-up were positively risk for the tendinopathy (OR = 3.7; 95% CI = 1.2 – 11.2 and OR = 2.3; 95% CI = 1.4 – 3.8, respectively). The allelic frequency of the *TNF- α* SNPs were *-1031C* 24.1% and 25.9%, *-857T* 8.1% and 9.3%, *-308A* 10.0% and 15.2% in controls and tendinopathy cases, respectively. After adjustment for confounding factors, the genotypes *TNF- α* *-308G>A* distribution was significantly different between cases and controls, besides variant genotype *TNF- α* *-308AA* was present only in athletes with tendinopathy. In addition, *TNF- α* (*-1031T>C*, *-857C>T* and *-308G>A*) haplotype *TCA* was associated with increased tendinopathy risk (OR: 2.65, 95% CI: 1.32 – 5.30).

Conclusion: The *TNF- α* SNPs, high BMI and nutritional follow-up were positively associated with tendinopathy (risk approximate 3-fold). This finding may to contribute to creating sports injury surveillance programmes using genetic information aim reduce cases

of the illness.

Key Terms: tendinopathy; polymorphism; TNF- α ; athletes.

Introduction

Tendinopathy is characterized by pain, swelling, structural change and functional limitation of the tendon due to overuse.^{1,2} Modifiable and non-modifiable risk factors are associated with disease, being a common injury in workers of occupational exposure (2 - 8.5%) and even more prevalent in athletes (15 - 50%).³ It is the main reason for clinical musculoskeletal complaint;⁴ however, the etiology of tendinopathy remains uncertain.

Molecular inflammation have been implicated as mechanism in early stages of tendinopathies, including pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and growth factors.^{1,5,6} Macrophages, mast cells, fibroblasts and endothelial cells synthesized and released TNF- α cytokine, which is the main chemokine inducer when tendons are mechanically overloaded.¹ TNF- α signaling is mediated by two functionally distinct receptors: TNF- α receptor-1 (TNFR1) and TNF- α receptor-2 (TNFR2). The interaction TNF- α – TNFR1 is responsible for induce apoptosis and proinflammatory effects, while the interaction TNF- α – TNFR2 is related to growth-modulating effect and tissue repair.⁷ A experimental tendinopathy model produced by overuse shown that *TNF- α* mRNA was increased 11-fold in torn supraspinatus tendon compared to control.⁸ In addition, TNF- α and its receptors were expressed in peritendinous tissue,⁹ and in rounded/enlarged nucleus human tenocytes, a typical characteristic of tendinopathy.¹⁰

TNF- α is encoded by the gene of the same name, located in chromosome 6p21.3 between human leukocyte antigen-B (*HLA-B*) and human leukocyte antigen-DR (*HLA-DR*)

genes at the major histocompatibility complex class III region.¹¹ Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter region of *TNF- α* gene, such as *-1031T>C* (rs1799964), *-857C>T* (rs1799724) and *-308G>A* (rs1800629), have shown potential to cause structural changes and to increase the *TNF- α* expression.^{12,13} Previous studies associated these *TNF- α* SNPs with some diseases, such as inflammatory bowel diseases,¹⁴ Congenital Zika syndrome,¹⁵ and cystic fibrosis.¹⁶

As far as we know, there are no studies evaluating the influence of *TNF- α* SNPs on tendinopathy development. Thus, this study aimed to investigate the role of promoter *TNF- α* SNPs as possible risk factors involved in the inflammatory molecular mechanism leading to tendinopathy.

Methods

This case-control study was approved by the Human Ethics Committee of the *Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad* (protocol number 2.455.630/2017). All participating athletes provided written informed consent and answered a questionnaire about their epidemiological, clinical, sport and training characteristics, as well as tendon injury history and their specific information such as type, location and number of tendinopathy episodes. At the end of data collection, a trained observer checked the questionnaire with each athlete, and the database was double-checked by different trained researchers.

The inclusion criteria were Brazilian competitive levels athletes aged 18-45 years old who recruited between March 2018 and September 2019 at different sports training centres and competitions. One hundred thirty-five athletes had tendinopathy clinically diagnosed by medical practitioners and confirmed with magnetic resonance image examination (MRI). All tendinopathy diagnoses were confirmed by two blinded

specialized orthopaedists, as described in previous studies.^{6,17} The control group (N = 135) consisted of athletes without previous imaging diagnosis of tendinopathy and who was matched at the tendinopathy cases by a same age (difference of ± 2 years), sex, sport modality and training / competition locations. The Figure 1 depicts the flowchart of controls matching tendinopathy cases in the study.

Fig. 1. around here

Genomic DNA of the athletes was obtained from oral mucosa collected by swab. The genotyping analyses of *TNF- α* -1031T>C (rs1799964), -857C>T (rs1799724) and -308G>A (rs1800629) polymorphisms were performed using a TaqMan allelic discrimination assay obtained from Applied Biosystems (C___7514871_10, C__11918223_10 and C___7514879_10, respectively). For all polymorphisms real-time polymerase chain reaction (PCR) reactions were performed on a 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the genotypes were then determined directly.

The sample size was calculated using Epi Info 7, version 7.1.3. (<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/html/downloads.htm>) to detect a difference between case and control groups, assuming an odds ratio of 2.0 with a power of 0.8 and 5% type I error.

Comparisons of continuous variables between tendinopathy cases and controls groups were performed using the Student's t test, and data were presented as mean \pm standard deviation (SD). Otherwise, the categorical data, as well as for the statistical analysis of the distribution frequencies of genotypes and alleles between the two groups were expressed as percentages and evaluated by Chi-Square Test (χ^2) or Fisher's exact test, where applicable.

Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) were assessed by the goodness-of-fit χ^2 test. *TNF- α* (-1031T>C, -857C>T, -308G>A) allele frequency and genotype distribution were derived by gene counting and frequencies between the two groups were compared using the χ^2 test or, when appropriate, the Fisher's exact test. The haplotype patterns and linkage disequilibrium coefficients (D' is degree of imbalance in module and R^2 is degree of correlation) were inferred using Haploview, as previously described.¹⁸

Multivariate logistic regression analyses model were performed to evaluate the possible associations between epidemiological, clinic, sport and training characteristics as much as of the polymorphisms with tendinopathy, which was estimated by the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI). As a final regression model used to control possible confounding factors, each variable was introduced considering the biological and statistical significance of the univariate analysis, which a input significance level less than 0.25 ($p \leq 0.25$) and output significance was 0.05 ($p \leq 0.05$) at the regression model. The difference was statistically significant when $p < 0.05$. All analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, version 20.0).

Results

Of the 135 tendinopathy cases, 26 athletes (19.3%) reported more than one tendon affect. Thus, the distribution of tendinopathy by affect site was 63 (38.4%) in patellar, 49 (29.9%) in rotator cuff, 23 (14.1%) in Achilles, 15 (9.1%) in hand, 13 (7.9%) in epicondyles and 1 (0.6%) in abdomen. The demographic, clinical, sport and training characteristics variables of tendinopathy cases and controls were presented in Table 1. In summary, all variables were analyzed to identify possible confounding variables of the true association between SNPs and tendinopathy. Initially, the variables BMI ($p = 0.09$), alcohol

consumption ($p = 0.25$), nutritional follow-up ($p = 0.002$), declared preference ($p = 0.21$) and weekly training hours ($p = 0.15$) were inserted in the logistic regression model. After multivariate analysis, only BMI and nutritional follow-up remained in this model.

Table 1 around here

The distribution of *TNF- α* (*-1031T>C*, *TNF- α* *-857C>T* and *TNF- α* *-308G>A*) SNPs was in Hardy–Weinberg equilibrium. After adjustment by co-factors that remained in logistic regression model (BMI and nutritional follow-up), no significant differences were detected in allele or genotype distribution of *TNF- α* SNPs *-1031T>C* ($p = 0.52$ and $p = 0.30$, respectively), *- TNF- α* *-857C>T* ($p = 0.44$ and $p = 0.72$, respectively) and *TNF- α* *-308G>A* ($p = 0.07$ and $p = 0.06$, respectively) between tendinopathy cases and controls. However, variant genotype *TNF- α* *-308AA* was present only in athletes with tendinopathy. In addition, seven haplotypes could be inferred, which account 100% of the study population, in which after adjusting for confounding variables, there was positive risk association for the development of tendinopathy for the *TNF- α* *TCA* haplotype, when compared with the reference haplotype *TCG* (Table 2).

Table 2 around here

Discussion

Tendinopathy is a serious public health care problem and the knowledge of molecular mechanisms involved in its etiology remains ongoing search.¹⁹ Recent studies have been challenged the “degenerative process” paradigm, suggesting that tendon overload is linked a complex role of the inflammation on tendon homeostasis

dysregulation.^{5,17,19,20} Although the role of the inflammatory process is not clear and may vary depending of epidemiological profile of population, the degradation of tissue is associated to innate immune system and key cytokines, including TNF- α on early or late staging tendon disease.^{5,19}

Metabolic diseases related to increased adiposity has been identified as important potentially modifiable risk factor for onset and progression a variety of tendinopathies.²⁰ Adipose tissue is tightly associated with tendon inflammation and early tissue degeneration.²¹ High BMI and nutritional follow-up were non-modifiable risk factors for tendinopathy in our athletes. The increased BMI in athletes can result in nutritional monitoring for muscle mass gain, which optimizes the athlete's performance and physical ability;²² however, nutritional supplements may be a key component in the etiology of various diseases,^{23,24} and diet can contribute negatively with tendon homeostasis.²⁰

Inflammatory genetic variables were associated as non-modifiable factors for developing tendinopathies.^{6,17,25} These studies have been important for understanding the molecular mechanism involved in the etiology of the disease and for control mechanical stress on the tendon of athletes most likely to develop overuse injuries.²⁶ Under normal physiological conditions TNF- α level is not detectable in tendon;¹⁰ however, overloading and mechanical stress may induce the secretion of TNF- α by tenocytes and cause change cellular proliferation, onset of pain and ECM degradation.¹ TNF- α level was detect in human tenocytes of Achilles tendinopathy samples, suggesting association with onset tissue apoptosis and in mechanotransduction failure to adapt tendon load.¹⁰ Moreover, the variation in TNF- α cytokines production is tightly regulated by genetic variants.²⁷

TNF- α polymorphisms in the promoter region site are strongly in linkage disequilibrium and creates established haplotypes that affect differently gene expression and activity.^{27,28} A significant difference in the genotypic distribution of *TNF- α – 308G>A*

SNP in the recessive co-dominance model between tendinopathy case and control was observed. In addition, *TNF- α* TCA (-1031T>C, -857C>T and -308G>A) haplotype characterized by the presence of the variant allele of *TNF- α* - 308A was associated with an increased risk of disease (2-3 fold). The *TNF- α* - 308G>A polymorphism is functional and the presence of variant allele - 308A promote loss of transcription factors like activator protein-2 binding, increasing the level of gene transcription.²⁸ This may explain the increased level of *TNF- α* mRNA found in the degenerate tendon;^{8,10} and consequently contribute to inter-individual variation in tendinopathy development. Thus, this finding can be used in future studies to better understand the influence of genetic factors in the tendinopathy susceptibility and contribute to create sports injury surveillance programmes using genetic information aim reduce cases of the illness in athletes.

Despite the small number of athletes with different types of tendinopathies being the main limitation of this study, the control group was matched carefully by age, sex, sport modality and training / competition locations to minimize the influence of the confounding factors. In addition, there were double-checked of the database by different trained researchers strengthen the quality of the results found in present study. Although, the variant genotype of the *TNF- α* -308G>A is low frequency (approximately 0 – 2%) in the Brazilian population,^{29,30} the results can be used to build a database from different populations to identify modifiable and non-modifiable risk factors associated with tendinopathy development in athletes.

Conclusion

The high BMI and nutritional follow-up were positively associated as modifiable factor of tendinopathy, whereas *TNF- α* polymorphisms was potential non-modifiable risk associated with development of disease.

Practical Implicate

- The study improves the understanding of how polymorphisms within the inflammatory signaling pathway may modulate the susceptibility of tendinopathy.
- The presence of variant allele *TNF- α – 308A* may be explain the increased level of *TNF- α* mRNA in the degenerate tendon.
- The knowledge of genetic factors associated with tendinopathy development may contribute to clarify the molecular mechanism involved in the etiology of the disease, as well as improve the prognosis and athlete's career time.

References

1. D'Addona A, Maffulli N, Formisano S, Rosa D. Inflammation in tendinopathy. *Surgeon*. 2017;15:297-302.
2. Kaux JF, Forthomme B, Goff CL, Crielaard JM, Croisier JL. Current opinions on tendinopathy. *J Sports Sci Med*. 2011;10(2):238-53.
3. Hopkins C, Fu SC, Chua E, Hu X, Rolf C, Mattila VM, et al. Critical Review on the Socio-Economic Impact of Tendinopathy. *Asia-Pac. J. Sport. Med. Arthrosc. Rehabil. Technol*. 2016; 4:9–20.
4. Riley G. Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nature Clinical Practise Rheumatology*. 2008;4:82-89.
5. Millar NL, Murrell GA, McInnes IB. Inflammatory mechanisms in tendinopathy – towards translation. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(2):110–22.
6. Salles JI, Duarte ME, Guimarães JM, Lopes LR, Vilarinho Cardoso J, Aguiar DP, et al. Vascular endothelial growth factor Receptor-2 polymorphisms have protective effect

- against the development of tendinopathy in volleyball athletes. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167717.
7. Ihnatko R, Kubes M. TNF signaling: early events and phosphorylation. *Gen Physiol Biophys*. 2007;26:159–167.
 8. Millar NL, Wei AQ, Molloy TJ, Bonar F, Murrell GA. Cytokines and apoptosis in supraspinatus tendinopathy. *J Bone Joint Surg Br*. 2009;91:417–424.
 9. Spang C, Renström L, Alfredson H, Forsgren S. Marked expression of TNF receptors in human peritendinous tissues including in nerve fascicles with axonal damage - Studies on tendinopathy and tennis elbow. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2017;17(3):226-236.
 10. Gaida JE, Bagge J, Purdam C, Cook J, Alfredson H, Forsgren S. Evidence of the TNF- α system in the human Achilles tendon: expression of TNF- α and TNF receptor at both protein and mRNA levels in the tenocytes. *Cells Tissues Organs*. 2012;196(4):339-52.
 11. Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today*. 1993;14:349-352
 12. Zhang BB, Liu XZ, Sun J, Yin YW, Sun QQ. Association between *TNF alpha* gene polymorphisms and the risk of duodenal ulcer: a metaanalysis. *PLoS One*. 2013;8(2):e57167.
 13. Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech*. 2000;50:216–228.
 14. Nourian M, Chaleshi V, Pishkar L, Azimzadeh P, Baradaran Ghavami S, Balaii H, et al. Evaluation of tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA expression level and the rs1799964 polymorphism of the TNF- α gene in peripheral mononuclear cells of patients with inflammatory bowel diseases. *Biomed Rep*. 2017;6(6):698-702.

15. Santos CNO, Ribeiro DR, Cardoso Alves J, Cazzaniga RA, Magalhães LS, de Souza MSF, et al. Association Between Zika Virus Microcephaly in Newborns With the rs3775291 Variant in Toll-Like Receptor 3 and rs1799964 Variant at Tumor Necrosis Factor- α Gene. *J Infect Dis.* 2019;220(11):1797-1801.
16. Hassanzad M, Farnia P, Ghanavi J, Parvini F, Saif S, Velayati AA. TNF α -857 C/T and TNFR2 +587 T/G polymorphisms are associated with cystic fibrosis in Iranian patients. *Eur J Med Genet.* 2019;62(11):103584.
17. Salles JI, Lopes LR, Duarte MEL, Morrissey D, Martins MB, Machado DE, et al. Fc receptor-like 3 (-169T>C) polymorphism increases the risk of tendinopathy in volleyball athletes: a case control study. *BMC Med Genet.* 2018;19(1):119.
18. Perini JA, Cardoso JV, Berardo PT, Vianna-Jorge R, Nasciutti LE, Bellodi-Privato M, et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C > A, -460 T > C, -1154G >A, +405G > C and +936C > T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Womens Health.* 2014; 14:117-125.
19. Dakin SG, Newton J, Martinez FO, Hedley R, Gwilym S, Jones N, et al. Chronic inflammation is a feature of Achilles tendinopathy and rupture. *Br J Sports Med.* 2018;52(6):359-367.
20. Loiacono C, Palermi S, Massa B, Belviso I, Romano V, Gregorio AD, et al. Tendinopathy: Pathophysiology, Therapeutic Options, and Role of Nutraceuticals. A Narrative Literature Review. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(8).
21. Pingel J, Petersen MC, Fredberg U, Kjær SG, Quistorff B, Langberg H, et al. Inflammatory and Metabolic Alterations of Kager's Fat Pad in Chronic Achilles Tendinopathy. *PLoS One.* 2015;10(5):e0127811.

22. Hulens M, Vansant G, Lysens R, Claessens A, Muls E, Brumagne S. Study of differences in peripheral muscle strength of lean versus obese women: an allometric approach. *International Journal of Obesity*. 2001;25(5):676.
23. Scott A, Nordin C. Do Dietary Factors Influence Tendon Metabolism? In *Metabolic Influences on Risk for Tendon Disorders*. Springer: Cham, Switzerland. 2016;283–289.
24. DePhillipo NN, Aman ZS, Kennedy MI, Begley JP, Moatshe G, LaPrade RF. Efficacy of Vitamin C Supplementation on Collagen Synthesis and Oxidative Stress After Musculoskeletal Injuries: A Systematic Review. *Orthop. J. Sport Med.* 2018; 6:2325967118804544.
25. Diniz-Fernandes T, Godoy-Santos AL, Santos MC, Pontin P, Pereira CAA, Jardim YJ, et al. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and (MMP-8) gene polymorphisms promote increase and remodeling of the collagen III and V in posterior tibial tendinopathy. *Histol Histopathol*. 2018;33(9):929-936.
26. Maffulli N, Margiotti K, Longo UG, Loppini M, Fazio VM, Denaro V. The genetics of sports injuries and athletic performance. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2013;3(3):173–89.
27. Mandal RK, Khann MA, Hussain A, Akhter N, Jawed A, Dar SA, et al. A trial sequential meta-analysis of *TNF- α* –308G>A (rs800629) gene polymorphism and susceptibility to colorectal cancer. *Biosci Rep*. 2019;39(1):BSR20181052.
28. Karimi M, Goldie LC, Cruickshank MN, Moses EK, Abraham LJ. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of –308 *TNF* polymorphism function using a novel integrated reporter system. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17(11):1454–1462.

29. Rocha Loures MA, Macedo LC, Reis DM, Oliveira CF, Meneguetti JL, Martines GF, et al. Influence of TNF and IL17 Gene Polymorphisms on the Spondyloarthritis Immunopathogenesis, Regardless of HLA-B27, in a Brazilian Population. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:1395823.
30. Oki E, Norde MN, Carioca AAF, Souza JMP, Castro IA, Marchioni DML, et al. Polymorphisms of the TNF- α gene interact with plasma fatty acids on inflammatory biomarker profile: a population-based, cross-sectional study in São Paulo, Brazil. *Br J Nutr.* 2017;117(12):1663-1673.

Figure Legend

Fig.1. Flowchart of the matched study population.

Table 1 Epidemiological, clinical, sport and training characteristics of the athletes (N = 270)

Variables	Control (N = 135)	Tendinopathy (N = 135)	<i>p</i> -value ^{a,b}	Crude OR (CI 95%)	Adjusted OR ^b (CI 95%)
N (%)					
Height (centimeters)^d					
≤ 166	36 (26.9)	34 (25.2)	0.75	1 ^c	1 ^c
167 – 175	38 (28.4)	40 (29.6)		1.11 (0.58 – 2.13)	0.91 (0.35 – 1.56)
176 – 181	29 (21.6)	25 (18.5)		0.91 (0.45 – 1.86)	0.66 (0.52 – 2.00)
≥ 182	31 (23.1)	36 (26.7)		1.23 (0.63 – 2.40)	0.90 (0.44 – 1.83)
BMI (Kg/m²)^e					
< 25	87 (65.4)	73 (54.5)	0.04	1 ^c	1 ^c
25 – 29.99	41 (30.8)	49 (36.6)		1.42 (0.35 – 2.39)	1.44 (0.85 – 2.46)
≥ 30	5 (3.8)	12 (8.9)		2.86 (0.93 – 2.50)	3.65 (1.20 – 11.16)
Skin colour^f					
White	48 (35.8)	58 (43.3)	0.71	1 ^c	1 ^c
Intermediate	47 (35.1)	44 (32.8)		0.77 (0.44 – 1.36)	0.77 (0.43 – 1.38)
Black	34 (25.4)	28 (20.9)		0.68 (0.36 – 1.28)	0.70 (0.36 – 1.35)
Others	5 (3.7)	4 (3.0)		0.66 (0.17 – 2.60)	0.93 (0.22 – 3.85)
Level of schooling^f					
Middle school	6 (4.5)	3 (2.2)	0.49	1 ^c	1 ^c
High school	60 (45.1)	56 (41.5)		1.87 (0.44 – 7.82)	1.80 (0.39 – 8.31)
University education	67 (50.4)	76 (56.3)		2.27 (0.55 – 9.43)	2.19 (0.48 – 10.02)
Alcohol consumption					
No	53 (39.3)	44 (32.6)	0.36	1 ^c	1 ^c
Yes	82 (60.7)	91 (67.4)		1.38 (0.81 – 2.20)	1.27 (0.76 – 2.14)
Smoking^d					
No	125 (93.3)	122 (90.4)	0.38	1 ^c	1 ^c
Yes	9 (6.7)	13 (9.6)		1.48 (0.61 – 3.59)	0.44 (0.57 – 3.59)

Nutritional follow-up					
No	78 (57.8)	52 (38.5)	0.001	1 ^c	1 ^c
Yes	57 (42.2)	83 (61.5)		2.18 (1.34 – 3.55)	2.31 (1.40 – 3.80)
Side of dominance					
Right	110 (81.5)	104 (77.0)	0.27	1 ^c	1 ^c
Left	11 (8.1)	20 (14.8)		1.92 (0.88 – 4.21)	1.67 (0.74 – 3.76)
Bilateral	14 (10.4)	11 (8.2)		0.83 (0.36 – 1.91)	0.69 (0.29 – 1.63)
Coach^d					
Certified athletic trainer	92 (68.1)	81 (60.4)	0.54	1 ^c	1 ^c
Former professional athlete	31 (23.0)	34 (25.4)		1.25 (0.70 – 2.20)	1.20 (0.66 – 2.17)
Both	12 (8.9)	19 (14.2)		1.80 (0.82 – 3.93)	1.53 (0.68 – 3.46)
Age at the beginning of sport practice (years)^d					
≤ 10	41 (30.3)	41 (30.6)	0.80	1 ^c	1 ^c
11 – 14	32 (23.7)	29 (21.6)		0.91 (0.47 – 1.76)	0.97 (0.48 – 1.95)
15 – 19	31 (23.0)	37 (27.6)		1.19 (0.63 – 2.27)	1.33 (0.66 – 2.66)
≥ 20	31 (23.0)	27 (20.1)		0.87 (0.44 – 1.71)	0.99 (0.48 – 2.04)
Years of training^d					
≤ 5	49 (36.3)	38 (28.4)	0.84	1 ^c	1 ^c
6 – 8	25 (18.5)	27 (20.1)		1.39 (0.70 – 2.77)	1.28 (0.63 – 2.61)
9 – 12	32 (23.7)	35 (26.1)		1.41 (0.74 – 2.67)	1.29 (0.65 – 2.57)
≥ 13	29 (21.5)	34 (25.4)		1.51 (0.79 – 2.90)	1.28 (0.65 – 2.52)
Weekly training hours					
≤ 7	38 (28.1)	32 (23.7)	0.46	1 ^c	1 ^c
8 – 12	49 (36.3)	38 (28.1)		0.92 (0.49 – 1.73)	0.86 (0.44 – 1.68)
13 – 17	22 (16.3)	24 (17.8)		1.29 (0.61 – 2.73)	1.22 (0.56 – 2.66)
≥ 18	26 (19.3)	41 (30.4)		1.87 (0.95 – 3.70)	1.45 (0.70 – 2.99)

OR is Odds ratio; CI is confidence interval. ^a p -value ≤ 0.05 was obtained through the Chi-squared Test (Pearson p -value). ^b OR adjusted by BMI and nutritional follow-up. ^c Reference value. ^d Information was obtained from 269 athletes. ^e Information was obtained from 267 athletes. ^f Information was obtained from 268 athletes.

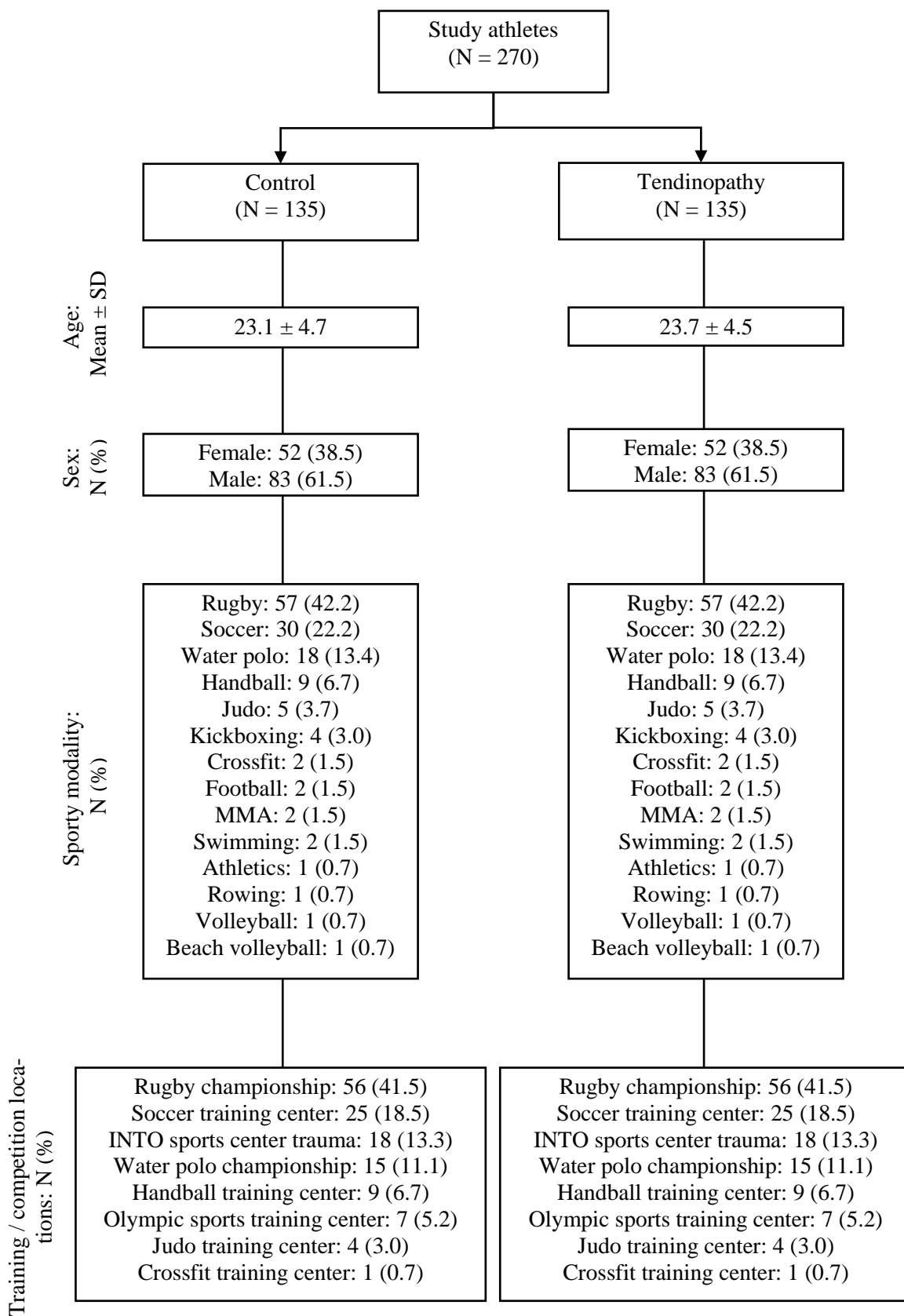
Table 2 Allelic, genotypic and haplotypic distributions of the *TNF- α* polymorphisms and their association with tendinopathy

SNPs	Control (N = 135)	Tendinopathy (N = 135)	<i>p</i> -value ^a	Adjusted OR ^b (CI 95%)
N (%)				
<i>TNF-α -1031T>C</i>				
<i>TT</i>	76 (56.3)	76 (56.3)	0.95	1 ^c
<i>TC+CC</i>	59 (43.7)	59 (43.7)		1.02 (0.62 – 1.67)
<i>TT+TC</i>	129 (95.6)	124 (91.9)	0.13	1 ^c
<i>CC</i>	6 (4.4)	11 (8.1)		2.21 (0.77 – 6.36)
<i>T</i>	205 (75.9)	200 (74.1)	0.52	1 ^c
<i>C</i>	65 (24.1)	70 (25.9)		1.14 (0.76 – 1.71)
<i>TNF-α -857C>T</i>				
<i>CC</i>	116 (85.9)	113 (83.7)	0.42	1 ^c
<i>CT+TT</i>	19 (14.1)	22 (16.3)		1.33 (0.66 – 2.67)
<i>CC+CT</i>	132 (97.8)	132 (97.8)	0.88	1 ^c
<i>TT</i>	3 (2.2)	3 (2.2)		1.14 (0.21 – 6.15)
<i>C</i>	248 (91.9)	245 (90.7)	0.44	1 ^c
<i>T</i>	22 (8.1)	25 (9.3)		1.28 (0.68 – 2.40)
<i>TNF-α -308G>A</i>				
<i>GG</i>	108 (80.0)	97 (71.9)	0.12	1 ^c
<i>GA + AA</i>	27 (20.0)	38 (28.1)		1.58 (0.88 – 2.85)
<i>GG + GA</i>	135 (100.0)	132 (97.8)	0.04	1 ^c
<i>AA</i>	0 (0.0)	3 (2.2)		-
<i>G</i>	243 (90.0)	229 (84.8)	0.07	1 ^c
<i>A</i>	27 (10.0)	41 (15.2)		1.63 (0.95 – 2.81)

TNF- α Haplotypes
(- 1031T>C, - 857C>T and - 308G>A)

TCG	172 (63.7)	148 (54.8)	0.11	1 ^c
TCA	15 (5.6)	31 (11.5)		2.65 (1.32 – 5.30)
TTG	14 (5.2)	18 (6.7)		1.74 (0.80 – 3.80)
TTA	4 (1.5)	3 (1.1)		0.79 (0.17 – 3.71)
CCG	53 (19.5)	59 (21.8)		1.35 (0.86 – 2.11)
CCA	8 (3.0)	7 (2.6)		1.03 (0.35 – 2.97)
CTG	4 (1.5)	4 (1.5)		1.50 (0.36 – 6.26)

OR is Odds ratio; CI is confidence interval. ^a p -value ≤ 0.05 was obtained through the Chi-squared Test (Pearson P -value). ^b OR adjusted by BMI and nutritional follow-up. ^c Reference value.



7 DISCUSSÃO

A tendinopatia é uma doença musculoesquelética degenerativa que promove alterações estruturais, como o aumento da produção de colágeno tipo III e uma hiper celularidade de fenótipo inflamatório no tecido, o que influencia nas propriedades mecânicas e funcionais do tendão (LOICANO et al., 2019, WANG, 2006). A alta incidência da doença e seu impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, em especial dos atletas profissionais têm sido um problema de saúde coletiva no âmbito da medicina esportiva, devido a dor e limitação de movimentos que afetam substancialmente o desempenho esportivo do atleta, a estabilidade tática da equipe e conseqüentemente com impacto social e econômico (PETERS et al., 2016; KAUX et al., 2011, YARD et al., 2008). Em casos severos da doença, muitos dos atletas precisam ser atendidos pelo SUS para uma terapêutica mais crônica, o que gera altos custos econômicos para a administração de saúde pública e suplementar com diagnósticos e tratamentos, e implica no maior tempo de afastamento esportivo, que por vezes concebe a aposentadoria precoce do atleta (LISMAN et al., 2017).

Apesar das diferenças dinâmicas, lógicas, estratégicas e de estilo de treinamento entre as modalidades esportivas, a etiologia da tendinopatia apresenta um caráter multifatorial resultante da interação de fatores não-modificáveis e modificáveis que contribuem para a variação do seu fenótipo heterogêneo no meio esportivo (HOPKINS et al., 2016). Os atletas de alto desempenho são altamente expostos ao intenso volume de treinamento e à repetição de movimentos padronizados. Um jogador de voleibol que realiza aproximadamente 40.000 ataques por ano pode representar de 8 a 20% da tendinopatia no manguito rotador por uso excessivo (CHALLOUMAS et al., 2017), e cerca de 45% da patelar devido ao ângulo de aterrissagem do joelho (ZWERVER et al., 2011). No presente trabalho, a tendinopatia em atletas brasileiros de voleibol foi mais frequente no joelho (63%) seguido pelo ombro (22%).

Assim, identificar os fatores envolvidos com o desenvolvimento da tendinopatia é essencial para implementação de programas de vigilância de lesões (BROMLEY et al., 2018). Estudos têm demonstrado que a idade e o sexo influenciam negativamente as propriedades mecânicas e materiais do tendão em atletas, aumentando o risco de lesão nessa população (HOPKINS et al., 2016, LOCAINO et al., 2019, KAUX et al., 2011). O resultado mostrado com atletas de voleibol aponta que atletas do sexo feminino apresentaram maior frequência de tendinopatia no ombro (41% no sexo feminino versus

17% no masculino) (SALLES et al., 2018), corroborando com os achados de um estudo não relacionado ao esporte de que o sexo feminino era um fator de risco para a doença (MOTA GDA et al., 2014).

Além disso, doenças metabólicas relacionadas ao aumento da adiposidade foram identificadas como um importante fator de risco modificável para o início e a progressão da tendinopatia, devido à ingestão excessiva de gordura influenciar a expansão das fibras do colágeno, a diminuição progressiva da elasticidade e a criação de um tecido mais rígido com dificuldade de absorver a carga mecânica (ABATE et al., 2009, LOICANO et al., 2019).

Ainda, o aumento de IMC encontrado nos atletas pode ser consequente de acompanhamentos nutricionais para ganho de massa muscular, o que otimiza o desempenho e habilidade física do atleta (HULENS et al., 2001, JOENG et al., 2018). Porém, uma dieta com deficiências nutricionais pode contribuir negativamente com a homeostase do tendão (LOICANO et al., 2019). O presente estudo encontrou o acompanhamento nutricional como um risco aproximado de 1,4 a 3,8 vezes para tendinopatia em atletas, o que sugere que a dieta é um componente essencial na etiologia da doença (SCOTT et al., 2016, DePFILLIPO et al., 2018). Dietas deficientes de vitamina C e D, pobres em leucina, lisina e glicemia diminui a síntese de colágeno tipo I e aumenta a exposição do tecido ao estresse oxidativo (LOICANO et al., 2019, DePFILLIPO et al., 2018, SCOTT et al., 2016). Além disso, dietas ricas em ácidos graxos saturados podem aumentar o nível de colesterol transportado na lipoproteína de baixa densidade (LDL), e sua forma oxidada (oxLDL) tem um alto potencial patogênico, resultando em apoptose dos tenócitos, expressão gênica reduzida de *COL1A1* e *COL3A1* e superexpressão de colagenase (GREWAL et al., 2014).

Recentemente, polimorfismos genéticos vêm sendo associados como fatores de risco não modificáveis para o desenvolvimento de tendinopatia (SALLES et al., 2016, KIM et al., 2017, DINIZ-FERNANDEZ et al., 2018, NIE et al., 2019). O estudo genético aplicado ao esporte tem sido uma ferramenta almejada pela medicina esportiva para criação de programas preventivos de lesões, que objetiva mitigar o excesso de estresse mecânico no tendão dos atletas, sugerindo treinamentos individualizados para favorecer o ápice de desempenho esportivo e o maior tempo de carreira do atleta (MAFFULLI, 2013). Além disso, a análise de polimorfismos genéticos contribui para a compreensão do mecanismo molecular envolvido na etiologia da doença, principalmente no seu estágio inicial, que ocorre o desequilíbrio homeostático entre regeneração tecidual ou progressão

da lesão (DAKIN et al., 2018, MILLAR et al., 2017, D'ADDONA et al., 2017).

Na presença de um estresse primário no tendão, ocorre alterações estruturais no microambiente e o recrutamento de macrófagos, mastócitos e linfócitos T CD4⁺ que liberam citocinas pró-inflamatórias para reparar o dano provocado por esse estímulo (MILLAR et al., 2017). Embora o papel do mecanismo inflamatório não seja muito claro e possa variar dependendo do local do tendão e do perfil epidemiológico da população, a degradação do tecido está associada ao aumento de liberação e a não modulação de citocinas pró-inflamatórias que promovem alterações na proliferação celular, início da dor e degradação da matriz extracelular (MILLAR et al., 2017, DAKIN et al., 2018, DEAN et al., 2017). Gaida et al. (2012) encontraram altos níveis de RNAm e de proteína do TNF- α em tenócitos humanos arredondados característicos de tendinopatia, no qual sugeriram que o TNF- α causa uma sinalização de efeito autócrino e parácrino, promovendo a apoptose tecidual inicial e a falha na função tendínea.

É sabido que a variação da produção de TNF- α é fortemente regulada por variantes genéticas (VERWEIJ et al., 1999, MANDAL et al., 2019). Os polimorfismos localizados na região promotora de *TNF- α* estão fortemente em desequilíbrio de ligação e criam haplótipos estabelecidos que afetam diferentemente a expressão e a atividade gênica (KARIMI et al., 2009, MANDAL et al., 2019). O resultado encontrado no presente estudo mostra uma diferença significativa na distribuição genotípica do polimorfismo *TNF- α - 308G>A* no modelo de co-dominância recessiva entre os grupos casos de tendinopatia e controles. Além disso, o haplótipo *TNF- α TCA (-1031T>C, -857C>T e -308G>A)* caracterizado pela presença do alelo variante do *TNF- α - 308A* foi associado a um risco aumentado do desenvolvimento da doença. O polimorfismo *TNF- α - 308G>A* é funcional, no qual a troca de nucleotídeo T (timina) pelo A (adenina) localizado nesse locus promove a perda de fatores de transcrição repressores, o que aumenta o nível de transcrição gênica (KARIMI et al., 2009, WILSON et al., 1997). Isso pode explicar o aumento do nível de mRNA do *TNF- α* encontrado em tendões degenerados de humanos ou de animais, enquanto que em tendões saudáveis não são detectados níveis de *TNF- α* (HOSAKA et al., 2005, MILLAR et al., 2009, GAIDA et al., 2012).

Entretanto, mediante a um estresse crônico de sobrecarga e um aumento da inflamação no tendão, as células Treg são ativadas via contato direto com a célula T CD4⁺, inibindo o fator nuclear NFAT e regulando a expressão de genes alvo na resposta inflamatória (HORI et al., 2003; MELO; CARVALHO, 2009). Como já descritos em outras condições patológicas, polimorfismos genéticos podem modular a função de Tregs,

prejudicando o reparo tecidual (HAGHIGHI et al., 2015; KWON et al., 2017; BEN JMAA et al. 2017). Os achados desse estudo encontraram uma associação positiva do alelo variante *FcRL3 - 169C* tanto para o desenvolvimento da tendinopatia, quanto aos sintomas dolorosos característicos de inflamação. A presença do nucleotídeo C (citosina) nessa região aumenta a afinidade de ligação do fator NF- κ B ao DNA, promovendo o aumento da transcrição gênica de *FcRL3* nas células Treg e gerando níveis mais altos de ativação imune (SWAINSON et al., 2010). Além disso, apesar de não ter sido encontrado associação com o polimorfismo *FOXP3 -2383C>T*, o efeito combinado entre os genótipos de *FcRL3-FOXP3* sugere um efeito cumulativo gene-gene que contribui para a inflamação envolvida na degradação da matriz extracelular tendínea.

A principal limitação do estudo foi o risco de viés de memória nos questionários autorrelatados e a omissão de informações de dados durante a carreira esportiva, devido a este estudo ter sido realizado com casos prevalentes. No entanto, o estudo apresenta como pontos fortes: o tamanho da amostra, a seleção do estudo não-pareado com atletas de elite de voleibol brasileiros que eram submetidos as mesmas exposições quanto a intensidade de treinamento, condições nutricionais e ambientais, a seleção pareada do estudo com diversos atletas para controlar o risco de viés de seleção e obter a real magnitude de associação dos polimorfismos analisados, e por fim, a logística de conferência do banco de dados que favoreceu a qualidade das análises. Nossos dados podem ser utilizados em estudos futuros para entender melhor a influência de fatores genéticos na suscetibilidade da tendinopatia e contribuir para desenvolvimento de novos métodos terapêuticos e para a criação de programas de vigilância de lesões, evitando a cessação precoce da carreira profissional dos indivíduos, reduzindo o custo/impacto social e econômico.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que as características epidemiológicas como idade avançada, sexo masculino, alto IMC, acompanhamento nutricional e maior tempo de prática no esporte foram associadas positivamente com a tendinopatia em atletas brasileiros. Além disso, o haplótipo formado pelos polimorfismos de *TNF- α* -1031T>C, -857C>T, -308G>A, e o efeito cumulativo dos polimorfismos *FCRL3* -169T>C e *FOXP3* -2383C>T foram associados como um potencial risco não modificável ao desenvolvimento da tendinopatia.

REFERÊNCIAS

- ABAT, F. et al. Current trends in tendinopathy: consensus of the ESSKA basic science committee. Part I: biology, biomechanics, anatomy and an exercise-based approach. **Journal of experimental orthopaedics**, v. 4, n. 1, p. 18, 2017.
- ABATE, Michele et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration?. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 3, p. 235, 2009.
- ALEXANDRE, Pedro Celso Braga et al. Musculoskeletal disorders among Brazilian dentists. **Archives of environmental & occupational health**, v. 66, n. 4, p. 231-235, 2011.
- ALI, Shahina; KAUR, Jaswinder; PATEL, Kamala D. Intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and regulated on activation normal T cell expressed and secreted are expressed by human breast carcinoma cells and support eosinophil adhesion and activation. **The American journal of pathology**, v. 157, n. 1, p. 313-321, 2000.
- BAJPAI, Urmila D. et al. A functional variant in FCRL3 is associated with higher Fc receptor-like 3 expression on T cell subsets and rheumatoid arthritis disease activity. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 8, p. 2451-2459, 2012.
- BARRETT, Jeffrey C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-265, 2004.
- BASSUNY, Wafaa M. et al. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. **Immunogenetics**, v. 55, n. 3, p. 149-156, 2003.
- BEAULIEU-JONES, Brendin R. et al. Epidemiology of injuries identified at the NFL Scouting Combine and their impact on performance in the National Football League: evaluation of 2203 athletes from 2009 to 2015. **Orthopaedic journal of sports medicine**, v. 5, n. 7, p. 2325967117708744, 2017.
- JMAA, Mariem Ben et al. Role of FOXP3 gene polymorphism in the susceptibility to Tunisian endemic Pemphigus Foliaceus. **Immunology letters**, v. 184, p. 105-111, 2017.
- BLOMGRAN, Parmis et al. A possible link between loading, inflammation and healing: Immune cell populations during tendon healing in the rat. **Scientific reports**, v. 6, p. 29824, 2016.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dor relacionada ao trabalho: lesões por esforços repetitivos (LER): distúrbios osteomusculares relacionados ao trabalho (DORT). 2012.
- BROMLEY, Sally J. et al. A systematic review of prospective epidemiological research into injury and illness in Olympic combat sport. **Br J Sports Med**, v. 52, n. 1, p. 8-16, 2018.
- BUCKLEY, Christopher D. et al. Stromal cells in chronic inflammation and tertiary

lymphoid organ formation. **Annual review of immunology**, v. 33, p. 715-745, 2015.

CALDER, James DF; STEPHEN, Joanna M.; VAN DIJK, C. Niek. Plantaris excision reduces pain in midportion Achilles tendinopathy even in the absence of plantaris tendinosis. **Orthopaedic Journal of Sports Medicine**, v. 4, n. 12, p. 2325967116673978, 2016.

CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE VOLEIBOL. Disponível em: <http://2017.cbv.com.br/>. Acesso em: 27 de maio de 2017.

CHALLOUMAS, Dimitrios; ARTEMIOU, Andreas; DIMITRAKAKIS, Georgios. Dominant vs. non-dominant shoulder morphology in volleyball players and associations with shoulder pain and spike speed. **Journal of sports sciences**, v. 35, n. 1, p. 65-73, 2017.

CHRISTOFORETTI, John J.; CARROLL, Raymond M. The thrower's shoulder. **Current Opinion in Orthopaedics**, v. 16, n. 4, p. 246-251, 2005.

COLLINS, Malcolm. Genetic risk factors for soft-tissue injuries 101: a practical summary to help clinicians understand the role of genetics and 'personalised medicine'. 2010.

COOK, Jillianne Leigh et al. Reproducibility and clinical utility of tendon palpation to detect patellar tendinopathy in young basketball players. **British journal of sports medicine**, v. 35, n. 1, p. 65-69, 2001.

COUPPÉ, Christian et al. Eccentric or concentric exercises for the treatment of tendinopathies?. **Journal of orthopaedic & sports physical therapy**, v. 45, n. 11, p. 853-863, 2015.

D'ADDONA, Alessio et al. Inflammation in tendinopathy. **The surgeon**, v. 15, n. 5, p. 297-302, 2017.

DABIJA, Dominique I. et al. Genetic and familial predisposition to rotator cuff disease: a systematic review. **Journal of shoulder and elbow surgery**, v. 26, n. 6, p. 1103-1112, 2017.

DAKIN, Stephanie G.; DUDHIA, Jayesh; SMITH, Roger KW. Resolving an inflammatory concept: the importance of inflammation and resolution in tendinopathy. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 158, n. 3-4, p. 121-127, 2014.

DAKIN, Stephanie Georgina et al. Chronic inflammation is a feature of Achilles tendinopathy and rupture. **Br J Sports Med**, v. 52, n. 6, p. 359-367, 2018.

DA ROCHA MOTTA, Geraldo et al. Evidence of genetic variations associated with rotator cuff disease. **Journal of shoulder and elbow surgery**, v. 23, n. 2, p. 227-235, 2014.

DEAN, Benjamin JF et al. Emerging concepts in the pathogenesis of tendinopathy. **The surgeon**, v. 15, n. 6, p. 349-354, 2017.

DEPHILLIPO, Nicholas N. et al. Efficacy of vitamin C supplementation on collagen

synthesis and oxidative stress after musculoskeletal injuries: a systematic review. **Orthopaedic journal of sports medicine**, v. 6, n. 10, p. 2325967118804544, 2018.

DINIZ-FERNANDES, Tulio et al. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and (MMP-8) gene polymorphisms promote increase and remodeling of the collagen III and V in posterior tibial tendinopathy. **Histol Histopathol**, v. 33, p. 929-936, 2018.

DOCHEVA, Denitsa et al. Biologics for tendon repair. **Advanced drug delivery reviews**, v. 84, p. 222-239, 2015.

EL KHOURY, Louis Y. et al. Promoter methylation status of the TIMP2 and ADAMTS4 genes and patellar tendinopathy. **Journal of science and medicine in sport**, v. 21, n. 4, p. 378-382, 2018.

EVERHART, Joshua S. et al. Treatment options for patellar tendinopathy: a systematic review. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 33, n. 4, p. 861-872, 2017.

FEARON, Angela M. et al. Greater trochanteric pain syndrome negatively affects work, physical activity and quality of life: a case control study. **The Journal of arthroplasty**, v. 29, n. 2, p. 383-386, 2014.

FERRETTI, Mário et al. Tendinopatia patelar. **RBM rev. bras. med**, v. 66, n. supl. 2, p. 62-68, 2009..

FESSEL, Gion; SNEDEKER, Jess G. Evidence against proteoglycan mediated collagen fibril load transmission and dynamic viscoelasticity in tendon. **Matrix biology**, v. 28, n. 8, p. 503-510, 2009.

FIGUEROA, David; FIGUEROA, Francisco; CALVO, Rafael. Patellar tendinopathy: diagnosis and treatment. **JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 24, n. 12, p. e184-e192, 2016.

FLEGAL, Katherine M. et al. Prevalência e tendências da obesidade entre adultos nos EUA, 1999-2000. **Jama**, v. 288, n. 14, p. 1723-1727, 2002.

FONSECA, T.V. **Estudo de associação de potenciais biomarcadores nos genes OLIG2, BDNF e NTRK3 para o Transtorno Obsessivo Compulsivo na população brasileira**. 2016. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Biotecnologia) – Universidade Federal Fluminense, Niterói.

FONT TELLADO, Sonia; BALMAYOR, Elizabeth R.; VAN GRIENSVEN, Martijn. Strategies to engineer tendon/ligament-to-bone interface: Biomaterials, cells and growth factors. **Advanced drug delivery reviews**, v. 94, p. 126-140, 2015.

FRANCESCHI, Francesco et al. Obesity as a risk factor for tendinopathy: a systematic review. **International journal of endocrinology**, v. 2014, 2014.

FUCHS, Yaron; STELLER, Hermann. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 16, n. 6, p. 329, 2015.

GAIDA, James Edmund et al. Evidence of the TNF- α system in the human Achilles tendon: expression of TNF- α and TNF receptor at both protein and mRNA levels in the tenocytes. **Cells Tissues Organs**, v. 196, n. 4, p. 339-352, 2012.

GONÇALVES-NETO, Joaquim et al. Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. **Joint Bone Spine**, v. 69, n. 2, p. 189-194, 2002.

GOUTTEBARGE, Vincent et al. Professional football players at risk for non-acute groin injuries during the first half of the season: a prospective cohort study in the Netherlands. **Journal of back and musculoskeletal rehabilitation**, v. 31, n. 1, p. 15-21, 2018.

GREWAL, Navdeep et al. Accumulation of oxidized LDL in the tendon tissues of C57BL/6 or apolipoprotein E knock-out mice that consume a high fat diet: potential impact on tendon health. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114214, 2014.

GWILYM, S. E. et al. Genetic influences in the progression of tears of the rotator cuff. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 91, n. 7, p. 915-917, 2009.

HAGHIGHI, Maryam Fazelzadeh et al. Investigation of FOXP3 genetic variations at positions-2383 C/T and IVS9+ 459 T/C in southern Iranian patients with lung carcinoma. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 18, n. 5, p. 465, 2015.

HERMANS, Job et al. Does this patient with shoulder pain have rotator cuff disease?: The Rational Clinical Examination systematic review. **Jama**, v. 310, n. 8, p. 837-847, 2013.

HOKSRUD, Aasne et al. Ultrasound-guided sclerosis of neovessels in patellar tendinopathy: a prospective study of 101 patients. **The American journal of sports medicine**, v. 40, n. 3, p. 542-547, 2012.

HOPE, Matthew; SAXBY, Terry S. Tendon healing. **Foot and ankle clinics**, v. 12, n. 4, p. 553-567, 2007.

HOPKINS, Chelsea et al. Critical review on the socio-economic impact of tendinopathy. **Asia-Pacific Journal of Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation and Technology**, v. 4, p. 9-20, 2016.

HORI, Shohei; NOMURA, Takashi; SAKAGUCHI, Shimon. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-1061, 2003.

HOSAKA, Yoshinao et al. Localization of cytokines in tendinocytes of the superficial digital flexor tendon in the horse. **Journal of veterinary medical science**, v. 64, n. 10, p. 945-947, 2002.

HOSAKA, Yoshinao et al. Differences in tumor necrosis factor (TNF) α and TNF receptor-

1-mediated intracellular signaling factors in normal, inflamed and scar-formed horse tendons. **Journal of veterinary medical science**, v. 67, n. 10, p. 985-991, 2005.

HUBBARD, Matthew J. et al. Common Soft Tissue Musculoskeletal Pain Disorders. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 45, n. 2, p. 289-303, 2018.

HULENS, Maria et al. Study of differences in peripheral muscle strength of lean versus obese women: an allometric approach. **International journal of obesity**, v. 25, n. 5, p. 676, 2001.

IHNATKO, Robert; KUBES, M. TNF signaling: early events and phosphorylation. *General physiology and biophysics*, v. 26, n. 3, p. 159, 2007.

JAFARI, Leila et al. Histopathological, biomechanical, and behavioral pain findings of Achilles tendinopathy using an animal model of overuse injury. **Physiological reports**, v. 3, n. 1, p. e12265, 2015.

JAHID, Mohd et al. Tumor necrosis factor- α -308 polymorphism in North Indian rheumatoid arthritis patients and association with mRNA and serum TNF- α . **Clinical rheumatology**, v. 36, n. 10, p. 2209-2216, 2017.

JOENG, Hee Seong et al. Injuries among Korean Female Professional Golfers: A Prospective Study. **Journal of sports science & medicine**, v. 17, n. 3, p. 492, 2018.

KARIMI, Mahdad et al. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. **European journal of human genetics**, v. 17, n. 11, p. 1454, 2009.

KAUX, Jean-François et al. Current opinions on tendinopathy. **Journal of sports science & medicine**, v. 10, n. 2, p. 238, 2011.

KHAN, Karim M. et al. Overuse tendinosis, not tendinitis: part 1: a new paradigm for a difficult clinical problem. **The Physician and sportsmedicine**, v. 28, n. 5, p. 38-48, 2000.

KHAN, Karim M. et al. Time to abandon the “tendinitis” myth: painful, overuse tendon conditions have a non-inflammatory pathology. 2002.

KIM, Stuart K. et al. A Genetic Marker Associated with De Quervain’s Tenosynovitis. **International journal of sports medicine**, v. 38, n. 12, p. 942-948, 2017.

KIM, Stuart K. et al. Two genetic variants associated with plantar fascial disorders. **International journal of sports medicine**, v. 39, n. 04, p. 314-321, 2018.

KOVACEVIC, David; RODEO, Scott A. Biological augmentation of rotator cuff tendon repair. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 466, n. 3, p. 622-633, 2008..

KUJALA, Urho M.; SARNA, Seppo; KAPRIO, Jaakko. Cumulative incidence of achilles tendon rupture and tendinopathy in male former elite athletes. **Clinical Journal of Sport**

Medicine, v. 15, n. 3, p. 133-135, 2005.

KWON, Tack-Kyun et al. Associations of FoxP3 gene polymorphisms with severe recurrent respiratory papillomatosis in Korean patients. **Journal of Otolaryngology-Head & Neck Surgery**, v. 46, n. 1, p. 21, 2017.

LAN, Wenjing et al. The Fc receptor-like 3 polymorphisms (rs7528684, rs945635, rs3761959 and rs2282284) and the risk of Neuromyelitis Optica in a Chinese population. **Medicine**, v. 94, n. 38, 2015.

LEITE, Patricia Campos; MERIGHI, Miriam Aparecida Barbosa; SILVA, Arlete. The experience of a woman working in nursing suffering from De Quervain's disease. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 15, n. 2, p. 253-258, 2007.

LIAN, Østein B.; ENGBRETTSEN, Lars; BAHR, Roald. Prevalence of jumper's knee among elite athletes from different sports: a cross-sectional study. **The American journal of sports medicine**, v. 33, n. 4, p. 561-567, 2005.

LIN, Meng-Ting et al. Comparative effectiveness of injection therapies in rotator cuff tendinopathy: a systematic review, pairwise and network meta-analysis of randomized controlled trials. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 100, n. 2, p. 336-349. e15, 2019.

LISMAN, Peter J. et al. A Systematic Review of the Association Between Physical Fitness and Musculoskeletal Injury Risk: Part 1—Cardiorespiratory Endurance. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 31, n. 6, p. 1744-1757, 2017.

LOIACONO, Carlo et al. Tendinopatia: Fisiopatologia, Opções Terapêuticas e Papel da Nutracêutica. Uma revisão de literatura narrativa. **Medicina**, v. 55, n. 8, p. 447, 2019.

LONGO, Umile Giuseppe; RONGA, Mario; MAFFULLI, Nicola. Achilles tendinopathy. **Sports medicine and arthroscopy review**, v. 26, n. 1, p. 16-30, 2018.

LOPES, Jared E. et al. Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 3133-3142, 2006.

MAFFULLI, Nicola; WONG, Jason; ALMEKINDERS, Louis C. Types and epidemiology of tendinopathy. **Clinics in sports medicine**, v. 22, n. 4, p. 675-692, 2003.

MAGRA, Merzesh; MAFFULLI, Nicola. Genetics: does it play a role in tendinopathy?. 2007.

MAHONEY, James M. Imaging techniques and indications. **Clinics in podiatric medicine and surgery**, v. 34, n. 2, p. 115-128, 2017.

MANDAL, Raju K. et al. A trial sequential meta-analysis of TNF- α -308G> A (rs800629) gene polymorphism and susceptibility to colorectal cancer. **Bioscience reports**, v. 39, n. 1, p. BSR20181052, 2019.

MARSOLAIS, David; CÔTÉ, Claude H.; FRENETTE, Jérôme. Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. **Journal of orthopaedic research**, v. 19, n. 6, p. 1203-1209, 2001.

MAULIK, Shreya et al. Evaluation of the working posture and prevalence of musculoskeletal symptoms among medical laboratory technicians. **Journal of back and musculoskeletal rehabilitation**, v. 27, n. 4, p. 453-461, 2014.

MCCARREL, Taralyn M.; MINAS, Tom; FORTIER, Lisa A. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. **JBJS**, v. 94, n. 19, p. e143, 2012.

MCCORMACK, Sally. Ergonomic and behavioral interventions as the primary treatment for work-related lateral epicondylitis. **WORK-A JOURNAL OF PREVENTION ASSESSMENT & REHABILITATION**, v. 37, n. 1, p. 81-86, 2010.

MCFARLAND, Edward G.; BORADE, Amrut. Examination of the biceps tendon. **Clinics in sports medicine**, v. 35, n. 1, p. 29-45, 2016.

MEDINA, Flávia Santos; MAIA, Maria Zoreide Britto. Underreporting of repetitive strain injuries/work-related musculoskeletal disorders (RSI/WMSDs) from the perspective of healthcare workers from Palmas, Tocantins, Brazil. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 41, 2016.

MELO, Karina Mescouto; CARVALHO, Beatriz Tavares Costa. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Rev Bras Alergia Imunopatol**, v. 32, n. 5, p. 184-8, 2009.

RINCÓN, JF Mendoza et al. MHC2TA and FCRL3 genes are not associated with rheumatoid arthritis in Mexican patients. **Rheumatology international**, v. 36, n. 2, p. 249-254, 2016.

MILLAR, N. L. et al. Cytokines and apoptosis in supraspinatus tendinopathy. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 91, n. 3, p. 417-424, 2009.

MILLAR, Neal L. et al. Inflammation is present in early human tendinopathy. **The American journal of sports medicine**, v. 38, n. 10, p. 2085-2091, 2010

MILLAR, Neal L. et al. IL-17A mediates inflammatory and tissue remodelling events in early human tendinopathy. **Scientific reports**, v. 6, p. 27149, 2016.

MILLAR, Neal L.; MURRELL, George AC; MCINNES, Iain B. Inflammatory mechanisms in tendinopathy—towards translation. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 2, p. 110, 2017.

Ministério da Previdência e Assistência Social, 1987 Ministério de Estado da Previdência e Assistência Social. Portaria nº 4.062, de 6.8.87; dispõe sobre a tenossinovite como doença ocupacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1987.

MORAES, Paulo Wenderson Teixeira; BASTOS, Antonio Virgílio Bittencourt. Os sintomas de LER/DORT: um estudo comparativo entre bancários com e sem diagnóstico. **Psicologia: Ciência e Profissão**, v. 37, n. 3, p. 624-637, 2017.

MORATH, Oliver et al. The effect of sclerotherapy and prolotherapy on chronic painful Achilles tendinopathy—a systematic review including meta-analysis. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 28, n. 1, p. 4-15, 2018.

MORGAN, Sanell; VAN VUUREN, Elizabeth C. Janse; COETZEE, Frederik F. Causative factors and rehabilitation of patellar tendinopathy: A systematic review. **The South African journal of physiotherapy**, v. 72, n. 1, 2016.

MORITA, W. et al. Cytokines in tendon disease: A Systematic Review. **Bone & joint research**, v. 6, n. 12, p. 656-664, 2017.

MORTON, Sarah et al. Equivalence of online and clinician administration of a patellar tendinopathy risk factor and severity questionnaire. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 25, n. 5, p. 670-677, 2015.

MÜLLER, Martin R.; RAO, Anjana. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 9, p. 645, 2010.

MURTAUGH, Bryan; IHM, Joseph M. Eccentric training for the treatment of tendinopathies. **Current sports medicine reports**, v. 12, n. 3, p. 175-182, 2013.

NIE, Guanghua et al. Additional evidence supports association of common genetic variants in MMP3 and TIMP2 with increased risk of chronic Achilles tendinopathy susceptibility. **Journal of science and medicine in sport**, 2019.

ORCHARD, John W. et al. Comparison of injury incidences between football teams playing in different climatic regions. **Open access journal of sports medicine**, v. 4, p. 251, 2013.

ODA, Julie Massayo Maeda et al. Genetic polymorphism in FOXP3 gene: imbalance in regulatory T-cell role and development of human diseases. **Journal of genetics**, v. 92, n. 1, p. 163-171, 2013.

ÖZDOLAP, Şenay et al. Upper limb tendinitis and entrapment neuropathy in coal miners. **American journal of industrial medicine**, v. 56, n. 5, p. 569-575, 2013.

PARAMESWARAN, Narayanan; PATIAL, Sonika. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. **Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression**, v. 20, n. 2, 2010.

PAWŁOWICZ, Małgorzata et al. Coincidence of PTPN22 c. 1858CC and FCRL3-169CC genotypes as a biomarker of preserved residual β -cell function in children with type 1 diabetes. **Pediatric diabetes**, v. 18, n. 8, p. 696-705, 2017.

PENA, Sergio DJ et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

PENG, Yan; LI, Liu-Juan. TNF- α -308G/A polymorphism associated with TNF- α protein expression in patients with diabetic nephropathy. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 3, p. 3127, 2015.

PETERS, Janne A. et al. Preventive interventions for tendinopathy: A systematic review. **Journal of science and medicine in sport**, v. 19, n. 3, p. 205-211, 2016.

PINHO, J.F.S. **Eficácia do treino excêntrico no tratamento da tendinopatia patelar em atletas de alta competição**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. [sn].

REES, Jonathan D.; STRIDE, Matthew; SCOTT, Alex. Tendons—time to revisit inflammation. **Br J Sports Med**, v. 48, n. 21, p. 1553-1557, 2014.

REGO-PÉREZ, Ignacio; FERNÁNDEZ-MORENO, Mercedes; BLANCO, Francisco J. Gene polymorphisms and pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. **Current genomics**, v. 9, n. 6, p. 381-393, 2008.

RIBBANS, W. J.; COLLINS, M. Pathology of the tendo Achillis: do our genes contribute?. **The bone & joint journal**, v. 95, n. 3, p. 305-313, 2013.

ROCHA, Andreia Possatti da et al. Polimorfismos genéticos: implicações na patogênese do carcinoma medular de tireóide. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia= Brazilian archives of endocrinology and metabolism**. São Paulo. Vol. 51, n. 5 (jul. 2007), p. 723-730, 2007.

SAHRMANN, Shirley. **Movement system impairment syndromes of the extremities, cervical and thoracic spines-e-book**. Elsevier Health Sciences, 2010.

SAINI, Sundeep S. et al. Achilles tendon disorders. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 115, n. 11, p. 670, 2015.

SAKABE, Tomoya; SAKAI, Takao. Doenças osteomusculares - tendão. **Boletim médico britânico**, v. 99, n. 1, p. 211-225, 2011.

SAKATA, Rioko Kimiko; ISSY, Adriana Machado. Lesão por esforço repetitivo (LER) Doença osteomuscular relacionada ao trabalho-DORT. **Rev bras med**, v. 60, n. NE, p. 77-83, 2003.

SALLES, José Inácio et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2 polymorphisms have protective effect against the development of tendinopathy in volleyball athletes. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0167717, 2016.

SALLES, José Inácio et al. Fc receptor-like 3 (– 169T> C) polymorphism increases the risk of tendinopathy in volleyball athletes: a case control study. **BMC medical genetics**, v. 19, n. 1, p. 119, 2018.

SATOMI, Érika et al. Changes in histoanatomical distribution of types I, III and V collagen promote adaptative remodeling in posterior tibial tendon rupture. **Clinics**, v. 63, n. 1, p. 9-

14, 2008.

SCOTT, Alex; NORDIN, Cara. Do Dietary Factors Influence Tendon Metabolism?. In: **Metabolic Influences on Risk for Tendon Disorders**. Springer, Cham, 2016. p. 283-289.

SEPTEMBER, Alison; RAHIM, Masouda; COLLINS, Malcolm. Towards an understanding of the genetics of tendinopathy. In: **Metabolic Influences on Risk for Tendon Disorders**. Springer, Cham, 2016. p. 109-116.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **Journal of musculoskeletal and neuronal interactions**, v. 6, n. 2, p. 181, 2006.

SMITH, Craig A.; FARRAH, Terry; GOODWIN, Raymond G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. **Cell**, v. 76, n. 6, p. 959-962, 1994.

SPANG, Christoph et al. Marked expression of TNF receptors in human peritendinous tissues including in nerve fascicles with axonal damage-Studies on tendinopathy and tennis elbow. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 17, n. 3, p. 226, 2017.

SWAINSON, Louise A. et al. A expressão do gene de suscetibilidade autoimune FcRL3 em células T reguladoras humanas está associada a disfunção e altos níveis de morte celular programada-1. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p. 3639-3647, 2010.

TADROS, Anthony S.; HUANG, Brady K.; PATHRIA, Mini N. Muscle-tendon-enthesis unit. In: **Seminars in musculoskeletal radiology**. Thieme Medical Publishers, 2018. p. 263-274.

TASHJIAN, Robert Z. et al. Incidence of familial tendon dysfunction in patients with full-thickness rotator cuff tears. **Open access journal of sports medicine**, v. 5, p. 137, 2014.

TASHJIAN, Robert Z. et al. Genome-wide association study for rotator cuff tears identifies two significant single-nucleotide polymorphisms. **Journal of shoulder and elbow surgery**, v. 25, n. 2, p. 174-179, 2016.

TAYLOR, Sarah E. et al. Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 10, n. 1, p. 27, 2009.

TEERLINK, Craig C.; CANNON-ALBRIGHT, Lisa A.; TASHJIAN, Robert Z. Significant association of full-thickness rotator cuff tears and estrogen-related receptor- β (ESRRB). **Journal of shoulder and elbow surgery**, v. 24, n. 2, p. e31-e35, 2015.

THOMPSON, M.W.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. Genes in Population. **THOMPSON & THOMPSON Genética Médica**. 6ª ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2001. p 540.

TONE, Masahide; GREENE, Mark I. Cooperative regulatory events and Foxp3

expression. **Nature immunology**, v. 12, n. 1, p. 14, 2011.

UCHIDA, Hisaya et al. Stress deprivation simultaneously induces over-expression of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta in fibroblasts and mechanical deterioration of the tissue in the patellar tendon. **Journal of biomechanics**, v. 38, n. 4, p. 791-798, 2005

UDALOVA, Irina A. et al. Functional consequences of a polymorphism affecting NF- κ B p50-p50 binding to the TNF promoter region. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 24, p. 9113-9119, 2000.

VERWEIJ, Cornelis L. Tumour necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 58, n. suppl 1, p. I20-I26, 1999.

WALDÉN, Markus et al. Regional differences in injury incidence in European professional football. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 23, n. 4, p. 424-430, 2013.

WANG, Ching-Jen; HUANG, Hsuan-Ying; PAI, Chun-Hwan. Shock wave-enhanced neovascularization at the tendon-bone junction: an experiment in dogs. **The journal of foot and ankle surgery**, v. 41, n. 1, p. 16-22, 2002.

WANG, James H.-C. Mechanobiology of tendon. **Journal of biomechanics**, v. 39, n. 9, p. 1563-1582, 2006.

WANG, Yibo et al. Polymorphisms of KDR Gene are associated with coronary heart disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 8, p. 760-767, 2007.

WANG, Liqing et al. FOXP3⁺ regulatory T cell development and function require histone/protein deacetylase 3. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 3, p. 1111-1123, 2015.

WARDEN, Stuart J.; BRUKNER, Peter. Patellar tendinopathy. **Clinics in sports medicine**, v. 22, n. 4, p. 743-759, 2003.

WILSON, Anthony G. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 7, p. 3195-3199, 1997.

WU, Yongqing et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. **Cell**, v. 126, n. 2, p. 375-387, 2006.

WU, Bing et al. Cellular response and extracellular matrix breakdown in rotator cuff tendon rupture. **Archives of orthopaedic and trauma surgery**, v. 131, n. 3, p. 405-411, 2011.

XU, Yinghua; MURRELL, George AC. The basic science of tendinopathy. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 466, n. 7, p. 1528-1538, 2008.

YANG, Sujuan et al. Role of TNF–TNF receptor 2 signal in regulatory T cells and its therapeutic implications. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 784, 2018.

YARD, Ellen E. et al. The epidemiology of United States high school soccer injuries, 2005–2007. ***The American journal of sports medicine***, v. 36, n. 10, p. 1930-1937, 2008.

ZHANG, Haiyan et al. Association of FCRL3 genetic polymorphisms with endometriosis-related infertility risk: An independent study in Han Chinese. ***Medicine***, v. 94, n. 35, 2015

ZWERVER, Johannes; BREDEWEG, Steven W.; VAN DEN AKKER-SCHEEK, Inge. Prevalence of Jumper’s knee among nonelite athletes from different sports: a cross-sectional survey. ***The American journal of sports medicine***, v. 39, n. 9, p. 1984-1988, 2011.

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS COM O DESENVOLVIMENTO DE LESÕES ATRAUMÁTICAS EM ATLETAS

Pesquisador: Jamila Alessandra Perini Machado

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 81225817.0.0000.5273

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.455.630

Apresentação do Projeto:

Projeto muito bem estruturado, contendo todos os itens necessários para a adequada realização da pesquisa.

A lesão relacionada a prática do esporte pode promover redução da intensidade ou do nível da atividade física; necessidade de atendimento à saúde, o qual demanda um tratamento especializado; e que provoca um impacto social ou efeitos socioeconômicos no âmbito individual ou coletivo. A incidência constante de lesões atraumáticas no sistema musculoesquelético tem causado relevante preocupação aos profissionais da medicina esportiva. Cerca de 30% a 50% das lesões desportivas estão ligadas a uma sobrecarga do tecido musculoesquelético durante os treinamentos.

Os polimorfismos genéticos podem influenciar a degeneração tecidual por meio do efeito cumulativo de múltiplos polimorfismos e por envolver interações complexas entre múltiplos genes. Para entender a importância de cada alelo polimórfico, é necessário avaliar a contribuição de cada polimorfismo no fenótipo da lesão. Recentemente, nosso grupo analisou a influência de polimorfismos em genes envolvidos com o processo angiogênico (fator de crescimento endotelial vascular –VEGF e seu receptor KDR) no desenvolvimento da tendinopatia em atletas de elite de voleibol. Foi verificada uma associação negativa (proteção) com o

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão **CEP:** 20.940-070
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 **Fax:** (21)2134-5228 **E-mail:** cep.int@into.saude.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -



Continuação do Parecer: 2.455.630

desenvolvimento da tendinopatia em atletas que apresentaram o SNP KDR 1192G>A e os haplótipos CGA e CGT formados pelos SNPs KDR -604C>T; 1192G>A; 1719T>A26.

Desse modo, os projetos com atletas de alto desempenho podem ser eficazes para avaliar a contribuição dos genes envolvidos com a susceptibilidade das lesões relacionadas à prática do esporte, quando submetido a repetitivo e intenso estresse mecânico.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos da pesquisa seriam:

GERAL:

Avaliar a influência de polimorfismos em genes selecionados envolvidos com a etiologia de lesões musculares de repetição em atletas, atraumáticas, no tecido musculoesquelético.

ESPECÍFICOS:

Determinar a frequência de polimorfismos nos genes selecionados em atletas;

Avaliar a magnitude de associação de polimorfismos nos genes em estudo e o desenvolvimento de lesões musculares de repetição, atraumáticas, no tecido musculoesquelético;

Avaliar a influência dos polimorfismos nos subgrupos classificados pelas variáveis epidemiológicas, clínicas e moleculares de cada atleta.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A participação no estudo é voluntária e mesmo com a concordância em participar, é garantido o direito de desistir e interromper a participação a qualquer momento, sem necessidade de justificar esta decisão e o participante de pesquisa não terá nenhum prejuízo quanto à continuidade de seu tratamento na Instituição. Todas as informações pessoais obtidas durante o estudo estarão disponíveis apenas para os investigadores envolvidos no projeto ou para o próprio sujeito da pesquisa caso este solicite. As instruções quanto ao acesso aos resultados desta pesquisa, constam no TCLE.

Os resultados gerados com este estudo poderão indicar/sugerir se algum polimorfismo pode estar associado com o risco ou proteção do desenvolvimento de lesões atraumáticas dos tecidos musculoesqueléticos. O polimorfismo é uma característica genética que pode ou não estar relacionada a uma doença. Os voluntários que apresentarem tipo genético sugestivo para

Endereço: Avenida Brasil, n° 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

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



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -



Continuação do Parecer: 2.455.630

desenvolvimento de lesões relacionadas a prática do esporte serão orientados pelo médico responsável pelo estudo, Dr. Rodrigo Goes, em relação a eventuais exames para diagnóstico e/ou tratamento médico.

Benefícios:

Este estudo não trará nenhum benefício imediato para o participante de pesquisa, assim como não receberá qualquer tipo de recompensa pela sua participação. Caso seja de interesse do participante de pesquisa, o único benefício será saber sobre o genótipo dos polimorfismos estudados, e se o perfil do participante de pesquisa pode estar associado ou não com o desenvolvimento de lesões relacionadas a prática do esporte, podendo definir condutas de prevenção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de grande relevância para o esporte e para a área da saúde desportiva, uma vez que pretende avaliar a magnitude de associação de polimorfismos e o desenvolvimento de lesões musculares de repetição, atraumáticas.

Espera-se com a execução deste projeto que o conjunto de dados obtidos proporcione um avanço no conhecimento da etiologia, no diagnóstico e prognóstico da de lesões desportivas com intuito de contribuir para o conhecimento do seu surgimento e, principalmente, para aprimorar as diretrizes de diagnóstico e tratamento individualizado para cada atleta susceptível ao desenvolvimento dessas lesões.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente apresentados e encontram-se adequados.

- Folha de Rosto;
- Cronograma atualizado e com as etapas adequadas à realização da pesquisa;
- Declaração da Instituição Proponente assinada;
- TCLE;
- Declaração de Manuseio de material biológico para pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia - INTO;
- Orçamento próprio e material disponível na instituição proponente;
- Termo de Responsabilidade do Pesquisador;
- Termo de Compromisso de Pesquisador;
- Carta de Aprovação da Comissão Científica da Instituição Proponente.

Endereço: Avenida Brasil, n° 500
Bairro: São Cristóvão **CEP:** 20.940-070
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 **Fax:** (21)2134-5228 **E-mail:** cep.into@into.saude.gov.br



Continuação do Parecer: 2.455.630

Recomendações:

Que seja enviado relatórios periódicos sobre o desenvolvimento da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Senhor pesquisador, de acordo com o constante da Resolução CNS nº 466 de 2012, faz-se necessário apresentar ao CEP/INTO, através da Plataforma Brasil, a cada 06 (seis) meses o relatório de acompanhamento de sua pesquisa. Além disso, após a conclusão da pesquisa, deverá ser submetido na Plataforma Brasil, através da Notificação, o Relatório Final e a pesquisa concluída para apreciação do CEP/INTO.

Informamos que qualquer alteração realizada no protocolo de pesquisa aprovado deverá ser submetida à apreciação do CEP/INTO através do envio de uma emenda utilizando a Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1053427.pdf	18/12/2017 10:55:49		Aceito
Outros	CartaComissao.pdf	18/12/2017 10:55:19	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoCompromisso.pdf	18/12/2017 10:54:36	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoResponsabilidade.pdf	18/12/2017 10:54:20	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	15/12/2017 13:06:00	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Pesquisadores.pdf	15/12/2017 13:04:56	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoAtletasPlataforma.pdf	15/12/2017 11:45:00	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Orçamento	DeclaracaoOrçamento.pdf	15/12/2017 11:43:28	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Declaração do Patrocinador	DeclaracaoPatrocinador.pdf	15/12/2017 11:43:13	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
 Bairro: São Cristóvão CEP: 20.940-070
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2134-5000 Fax: (21)2134-5228 E-mail: cep.into@into.saude.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -



Continuação do Parecer: 2.455.630

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DeclaracaoMaterialBiologico.pdf	15/12/2017 11:42:57	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoInstituicaoInfra.pdf	15/12/2017 11:42:43	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	15/12/2017 11:42:30	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	15/12/2017 11:42:18	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 22 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Eduardo Branco de Sousa
(Coordenador)

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão CEP: 20.940-070
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 Fax: (21)2134-5228 E-mail: cep.into@into.saude.gov.br

ANEXO B - ESTUDO TRANSVERSAL - QUESTIONÁRIO VALIDADO POR ESPECIALISTAS

Goes et al. *BMC Musculoskeletal Disorders* (2020) 21:122
<https://doi.org/10.1186/s12891-020-3141-8>

BMC Musculoskeletal
Disorders

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Musculoskeletal injuries in athletes from five modalities: a cross-sectional study



Rodrigo Araújo Goes^{1†}, Lucas Rafael Lopes^{2,3,4†}, Victor Rodrigues Amaral Cossich^{2,5}, Vitor Almeida Ribeiro de Miranda¹, Olívia Nogueira Coelho⁵, Ricardo do Carmo Bastos¹, Letícia Aparecida Marincolo Domenis¹, João Antonio Matheus Guimarães², João Alves Grangeiro-Neto¹ and Jamila Alessandra Perini^{2,3,4*}

Abstract

Background: Musculoskeletal injuries (MSK-I) are a serious problem in sports medicine. Modifiable and non-modifiable factors are associated with susceptibility to these injuries. Thus, the aim of this study was to describe the prevalence of and identify the factors associated with MSK-I, including tendinopathy and joint and muscle injuries, in athletes.

Methods: In this cross-sectional observational study, 627 athletes from rugby ($n = 225$), soccer ($n = 172$), combat sports ($n = 86$), handball ($n = 82$) and water polo ($n = 62$) were recruited at different sports training centres and competitions. Athlete profiles and the prevalence of MSK-I were assessed using a self-reported questionnaire. Only previous MSK-I with imaging confirmation and/or a positive physical exam by a specialized orthopaedist were considered. The association of the epidemiological, clinical and sports profiles of athletes with MSK-I was evaluated by a logistic regression model.

Results: The mean age was 25 ± 6 years, and 60% of the athletes were male. The epidemiological, clinical and sports profiles of the athletes were different for the five sport groups. The MSK-I prevalence among all athletes was 76%, with 55% of MSK-I occurring in a joint, 48% occurring in a muscle and 30% being tendinopathy, and 19% of athletes had three investigated injuries. The MSK-I prevalence and injury locations were significantly different among sport groups. There was a predominance of joint injury in combat sports athletes (77%), muscle injury in handball athletes (67%) and tendinopathy in water polo athletes (52%). Age (≥ 30 years) was positively associated with joint (OR = 5.2 and 95% CI = 2.6–10.7) and muscle (OR = 4.9 and 95% CI = 2.4–10.1) injuries and tendinopathy (OR = 4.1 and 95% CI = 1.9–9.3).

Conclusion: There is a high prevalence of tendinopathy and joint and muscle injuries among rugby, soccer, combat sports, handball and water polo athletes. The analysis of associated factors (epidemiological, clinical and sports profiles) and the presence of MSK-I in athletes suggests an approximately 4–5-fold increased risk for athletes ≥ 30 years of age. The identification of modifiable and non-modifiable factors can contribute to implementing surveillance programmes for MSK-I prevention.

Keywords: Sports injury, Epidemiology, Tendinopathy, Joint injury, Muscle injury

* Correspondence: jamilaperini@yahoo.com.br; japerini@into.saude.gov.br

[†]Rodrigo Araújo Goes and Lucas Rafael Lopes contributed equally to this work.

²Research Division, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Avenida Brasil, 500, Rio de Janeiro, RJ 20940-070, Brazil

³Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacéuticas, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Musculoskeletal injuries (MSK-I) are some of the most severe health problems in sports medicine, resulting in high economic costs, withdrawal of athletes from training and competitions and potentially affecting athlete performance [1]. The prevalence of injury types and locations is different according to sport modality, varying from 5 to 60% for joint injuries [2, 3], 20–60% for muscle injuries [4, 5] and 10–50% for tendinopathy [6].

Non-modifiable and modifiable factors have been associated with MSK-I [1]. The multifactorial and dynamic nature of the MSK-I highlights the importance of knowing the confounding variables to assist biostatistical methods of surveillance in athlete health, which may contribute to injury prevention programmes, helping professionals involved with the training of athletes [7]. Thus, understanding the interaction between epidemiological and etiological factors involved with MSK-I is essential to the development and implementation of sports injury surveillance programmes [8]. Recently, our group showed that genetic factors were associated with tendinopathy development and were able to contribute to the identification of new therapeutic targets and personalized training programmes to prevent injury in athletes [9, 10].

As far as we know, there are no studies comparing athlete profiles and their associated factors with MSK-I among different sport modalities. Thus, the aim of this study was to describe the epidemiological, clinical and athletic profile of five sport modalities to verify the prevalence of and associated factors for tendinopathies and joint and muscle injuries in athletes.

Methods

Population and study design

The Human Ethics Committee of the *Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad* approved the study (protocol number 2.455.630/2017). A cross-sectional study was conducted with Brazilian athletes regarding the prevalence of and factors associated with MSK-I. The inclusion criteria were Brazilian athletes aged 18–45 years old who were symptomatic or asymptomatic for any MSK-I. All MSK-I diagnoses were confirmed by two blinded specialized orthopaedists. Athletes with a history of MSK-I for reasons unrelated to sports practice were excluded from the present study. Six hundred and twenty-seven athletes from the following sports were recruited between March and December 2018 at different sports training centres and competitions: 225 rugby, 172 soccer, 86 combat sports, 82 handball and 62 water polo. The participants provided written informed consent and answered a questionnaire about their demographic, epidemiological, clinical and sports profiles. All questionnaires were checked by an expert researcher together with the athlete.

Questionnaire

Brazilian athletes' profiles and MSK-I history were assessed using a self-reported questionnaire previously validated by an expert panel, which was divided into three sections regarding general, training and MSK-I-specific information (Additional file 1). First, the athletes reported general information that about their sociodemographic characteristics such as age, sex, skin colour, level of schooling (middle school, high school or university education), family income, and anthropometric measures (height and body mass index - BMI). Skin colour was reported according to the classification scheme of the Brazilian official census (*Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística* - IBGE), which employs only a few pre-established colour categories based on self-classification: white, intermediate, black, yellow or indigenous [11]. Family income also was categorized according to IBGE: A > 20, B = 10 to 20, C = 5 to 10 or D = 2 to 5 minimum wages. In addition, clinical characteristics such as nutritional monitoring (during sports careers), smoking (cigarette, hand-rolled tobacco, pipe, cigar or hookah), and alcohol consumption were also included as general information. Smoking was assessed as the number of times per day [12]. Alcohol consumption was assessed by the frequency of consumption per week (low: < 7 doses/week, moderate: 7 to 12 doses/week or high: > 21 doses/week) [13]. However, in this study, the athletes were categorized as "Yes" or "No" for smoking or drinking alcohol, regardless of the types and frequencies. The second section of the questionnaire was about sports and training characteristics. The athletes detailed the sport modality, their age at the beginning of competitive practice, the years of training and the weekly training hours. Finally, the third section of the questionnaire was regarding the MSK-I. The athletes detailed the type, location, number of episodes and time withdrawn from sports activities for injuries, according to Fuller and colleagues [14]. Of all self-reported injuries, only those with previous positive diagnoses by two blinded specialized orthopaedists (physical exam and/or imaging) were considered for this study.

Prevalence of MSK-I

The athletes reported a history of MSK-I and described the specific sites concerning muscle injuries (thorax, shoulder, arm and forearm, hip, thigh [anterior/posterior], leg [lateral/medial], calf, or others), joint injury or tendinopathy (shoulder, elbow, hand, hip, knee, ankle or others). The prevalence of MSK-I was calculated as the total number of injured athletes divided by the total number of athletes in each selected sport group, according to the self-reported questionnaire and a positive physical exam or imaging exam.

Statistical analysis

The normality distribution of studied population was determined by the Shapiro-Wilk test. Continuous variables were reported as mean \pm standard deviation (SD), differences in these values between sports modalities were tested by one-way analysis of variance (ANOVA). However, according to their distribution and clinical significance, for the analysis, continuous variables (age, height and age at the beginning of sport practice) were divided into quartiles, while years of training and weekly training hours were categorized into tertiles. Categorical data were shown in proportions and differences among sports using the Chi-squared (χ^2) statistic test or Fischer exact test, when applicable.

Multivariable logistic regression analyses were performed to identify possible confounding factors in the associations between sociodemographic, clinical, and athletic characteristics and joint and muscle injury or tendinopathy, which was estimated by the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI). Univariate characteristics with a *p*-value less than 0.25 were included in the multivariable logistic regression analysis. The difference was statistically significant when *p*-value was less than or equal to 0.05. All analyses were performed using the IBM SPSS 20.0 Statistics for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

The athletes' mean age was 24.7 ± 5.7 years old, 374 (59.6%) were male, 334 (53.3%) had a university education, and the mean BMI was 24.8 ± 3.5 kg/m². Four hundred and seventy-eight athletes (76.2%) reported MSK-I, and 89 (18.6%) athletes presented a history of multiple injuries (Fig. 1a). The prevalence of injuries in all recruited athletes was 55.0% (*n* = 345) for joint injuries, 47.8% (*n* = 300) for muscle injuries and 30.3% (*n* = 190) for tendinopathies. The Fig. 1b shows the prevalence of MSK-I in athletes by sport group. Sociodemographic, clinical and athletic characteristics categorized by sport groups, in addition to injury types and locations, are described in the Table 1.

Detailed descriptions of athletes' sociodemographic, clinical and athletic characteristics are shown by sport group.

Rugby

Rugby athletes (age: 24.5 ± 4.6 years old, height: 170 ± 10 cm, BMI: 24.9 ± 4.3 kg/m²) were mostly self-declared as having white skin colour (54.7%, *n* = 123), and 66.7% (*n* = 150) had a university education, 88 (39.1%) D class family income and 86 (38.2%) nutritional follow-up. Regarding the training time of athletes, the mean age at the beginning of sport practice was 18.6 ± 4.7 years, with the years of practice in the sport being 5.6 ± 4.4 years and

the training time being 9.9 ± 5.7 h/week. Of the 225 athletes, 170 (75.6%) reported a history of MSK-I. The most frequent injury types were joint (*n* = 137, 60.9%) and muscle (*n* = 96, 42.7%) (Fig. 1b). Five hundred and nine injuries were identified in total, of which the shoulder and lower extremities were the most affected locations (Table 1).

Soccer

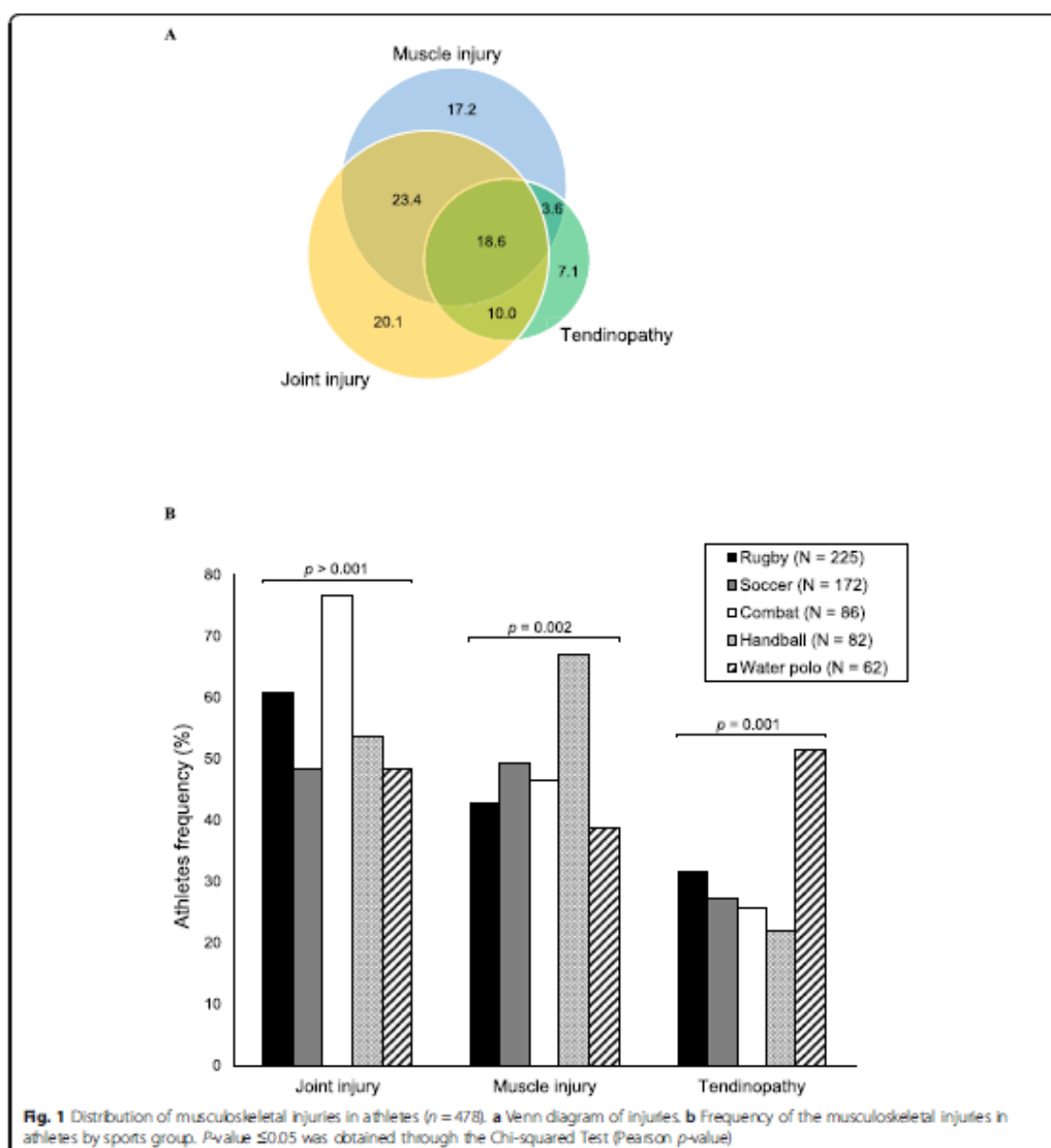
Soccer athletes (age: 24.6 ± 6.9 years old, height: 180 ± 20 cm, BMI: 23.6 ± 3.7 kg/m²) were mostly self-declared as intermediate (35.5%, *n* = 61) and white skin colour (33.7%, *n* = 58), and 117 (68.0%) had a high school degree, 62 (36.0%) C class family income and 115 (66.9%) nutritional monitoring. The training exposure of athletes showed that the mean age at the beginning of sport practice was 8.4 ± 3.5 years, with more practice time in the sport (13.9 ± 6.1 years) and weekly training hours (14.0 ± 7.0 h). One hundred thirty-four (77.9%) athletes had a history of MSK-I. Muscle and joint injuries were the most reported injuries in this sport (*n* = 85, 49.4% and *n* = 83, 48.3, respectively) (Fig. 1b). The main locations of muscle injury were the posterior and anterior thigh muscles (41.7 and 35.7%, respectively), while joint injury and tendinopathy were more frequent in the knee (Table 1).

Combat sports

The combat sports group comprised athletes from judo (*n* = 48, 55.8%), Brazilian jiu-jitsu (*n* = 18, 20.9%), kick-boxing (*n* = 8, 9.4%), MMA (*n* = 7, 8.1%) and wrestling (*n* = 5, 5.8%), with an age mean of 25.5 ± 6.6 years, height of 170 ± 10 cm and BMI of 25.8 ± 4.1 kg/m². The majority of athletes self-declared an intermediate skin colour (*n* = 34, 39.5%), had a university education (*n* = 54, 62.8%), had C or D class family income (*n* = 70, 81.4%) and had nutritional follow-up (*n* = 68, 79.1%). The mean age at the beginning of sport practice was 10.7 ± 5.9 years; thus, the training time of the athletes was 14.0 ± 6.9 years, with a mean weekly training duration of 16.1 ± 7.4 h. Among the reported MSK-I, joint injury was most prevalent (*n* = 66, 76.7%) in athletes (Fig. 1b), mainly in the knee and shoulder (Table 1).

Handball

The mean age of handball athletes was 25.2 ± 5.3 years, the mean height was 180 ± 10 cm, and the mean BMI was 24.1 ± 3.6 kg/m². Forty-eight athletes reported skin colour according to self-perception, of which 23 (47.9%) athletes were self-classified as intermediate. In addition, 53 (64.6%) had a university education, 44 (53.7%) had D class family income, and 31 (37.8%) had nutritional monitoring. The athletes reported that they started practicing the sport approximately 12.8 ± 4.0 years old; thus, training exposure characteristics showed that the mean time for participating in the sport was 11.9 ± 5.4 years, and the training time



was 10.9 ± 5.7 h/week. Muscle injury was more prevalent ($n = 55$, 67.1%) in this sport modality (Fig. 1b). The most affected locations were the ankle and knee for joint injuries, the posterior thigh for muscle injuries and the knee and shoulder for tendinopathy (Table 1).

Water polo

Athletes (age: 23.4 ± 5.1 years old, height: 180 ± 10 cm, BMI: 25.4 ± 3.7 kg/m²) were mostly self-declared as

having white skin colour (59.7%, $n = 37$), 38 (61.3%) had a university education, 52 (83.9%) had B and D class family income, and 36 (58.1%) performed nutritional follow-up. The training exposure characteristics show that these athletes started participating in sports approximately 11.8 ± 2.7 years old, had 11.5 ± 6.1 years of practice in the sport and approximately 15.3 ± 7.3 training hours/week. Thirty-two (51.6%) athletes reported a history of tendinopathy; the shoulder (65.8%) was the

Table 1 Socio-demographic, clinical, sport, training characteristics and injuries locations by sport group

Variables	Rugby n = 225	Soccer n = 172	Combat n = 86 n (%)	Handball n = 82	Water polo n = 62	P-value ^a
Age (years)						
< 20	28 (12.4)	58 (33.7)	15 (17.4)	12 (14.6)	20 (32.3)	< 0.001
20 to 24	96 (42.8)	47 (27.3)	32 (37.2)	27 (32.9)	20 (32.3)	
25 to 29	64 (28.4)	33 (19.2)	22 (25.6)	22 (26.8)	12 (19.3)	
≥ 30	37 (16.4)	34 (19.8)	17 (19.8)	21 (25.7)	10 (16.1)	
Sex						
Female	160 (71.1)	0 (0.0)	19 (22.1)	48 (58.5)	26 (41.9)	< 0.001
Male	65 (28.9)	172 (100.0)	67 (77.9)	34 (41.5)	36 (58.1)	
Height (centimeters)						
< 165	89 (39.6)	5 (2.9)	16 (18.6)	7 (8.5)	9 (14.5)	< 0.001
165 to 174	72 (32.0)	45 (26.2)	36 (41.9)	35 (42.7)	17 (27.4)	
175 to 184	49 (21.8)	72 (41.9)	25 (29.0)	21 (25.6)	15 (24.2)	
≥ 185	15 (6.6)	50 (29.1)	9 (10.5)	19 (23.2)	21 (33.9)	
Alcohol consumption ^b						
No	66 (29.3)	95 (55.2)	50 (58.8)	32 (40.0)	15 (24.2)	< 0.001
Yes	159 (70.7)	77 (44.8)	35 (41.2)	48 (60.0)	47 (75.8)	
Smoking ^c						
No	198 (88.0)	166 (96.5)	85 (98.8)	77 (95.1)	59 (95.2)	0.002
Yes	27 (12.0)	6 (3.5)	1 (1.2)	4 (4.9)	3 (4.8)	
Age at the beginning of sport practice (years)						
0 to 8	3 (1.3)	109 (63.3)	35 (40.7)	8 (9.8)	9 (14.5)	< 0.001
9 to 13	23 (10.2)	43 (25.0)	23 (26.8)	43 (52.4)	34 (54.9)	
14 to 18	84 (37.4)	20 (11.6)	21 (24.4)	27 (32.9)	19 (30.6)	
> 18	115 (51.1)	0 (0.0)	7 (8.1)	4 (4.9)	0 (0.0)	
Years of training						
0 to 5	131 (58.2)	8 (4.7)	9 (10.5)	12 (14.7)	8 (12.9)	< 0.001
6 to 10	71 (31.6)	44 (25.5)	19 (22.1)	22 (26.8)	29 (46.8)	
> 10	23 (10.2)	120 (69.8)	58 (67.4)	48 (58.5)	25 (40.3)	
Weekly training hours						
0 to 7	87 (38.7)	23 (13.4)	15 (17.4)	23 (28.1)	9 (14.5)	< 0.001
8 to 14	104 (46.2)	83 (48.3)	16 (18.6)	38 (46.3)	13 (21.0)	
15 to 21	25 (11.1)	44 (25.6)	33 (38.4)	17 (20.7)	30 (48.4)	
> 21	9 (4.0)	22 (12.8)	22 (25.6)	4 (4.9)	10 (16.1)	
Joint injury						
	233 (100.0)	100 (100.0)	158 (100.0)	36 (100.0)	51 (100.0)	< 0.001
Hand	43 (18.4)	3 (3.0)	24 (15.2)	1 (2.8)	8 (15.7)	
Elbow	11 (4.7)	0 (0.0)	22 (13.9)	4 (11.1)	8 (15.7)	
Shoulder	58 (24.9)	15 (15.0)	34 (21.5)	7 (19.5)	16 (31.4)	
Knee	44 (18.9)	45 (45.0)	45 (28.5)	11 (30.5)	12 (23.5)	
Ankle	72 (30.9)	34 (34.0)	27 (17.1)	12 (33.3)	3 (5.9)	
Hip	5 (2.2)	3 (3.0)	6 (3.8)	1 (2.8)	4 (7.8)	
Muscle injury						
	192 (100.0)	115 (100.0)	87 (100.0)	101 (100.0)	43 (100.0)	< 0.001
Thoracic	12 (6.2)	1 (0.9)	8 (9.2)	3 (3.0)	2 (4.6)	

Table 1 Socio-demographic, clinical, sport, training characteristics and injuries locations by sport group (Continued)

Variables	Rugby n = 225	Soccer n = 172	Combat n = 86 n (%)	Handball n = 82	Water polo n = 62	P-value ^a
Forearm and arm	17 (8.8)	1 (0.9)	8 (9.2)	9 (8.9)	8 (18.7)	
Shoulder	33 (17.2)	3 (2.6)	19 (21.8)	16 (15.8)	20 (46.5)	
Anterior thigh	27 (14.1)	41 (35.7)	10 (11.5)	16 (15.8)	2 (4.6)	
Posterior thigh	42 (21.9)	48 (41.7)	15 (17.3)	28 (27.8)	2 (4.6)	
Lateral/medial leg	18 (9.4)	2 (1.7)	6 (6.9)	11 (10.9)	0 (0.0)	
Calf	26 (13.5)	15 (13.0)	10 (11.5)	7 (6.9)	2 (4.6)	
Hip	14 (7.3)	3 (2.6)	7 (8.0)	5 (5.0)	7 (16.4)	
Others	3 (1.6)	1 (0.9)	4 (4.6)	6 (5.9)	0 (0.0)	
Tendinopathy	84 (100.0)	51 (100.0)	30 (100.0)	21 (100.0)	38 (100.0)	< 0.001
Hand	9 (10.7)	3 (5.9)	9 (30.0)	2 (9.5)	1 (2.6)	
Elbow	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (10.0)	2 (9.5)	7 (18.4)	
Shoulder	23 (27.4)	9 (17.6)	9 (30.0)	7 (33.3)	25 (65.8)	
Knee	30 (35.7)	30 (58.9)	3 (10.0)	9 (42.9)	4 (10.6)	
Ankle	18 (21.4)	9 (17.6)	4 (13.3)	0 (0.0)	1 (2.6)	
Others	4 (4.8)	0 (0.0)	2 (6.7)	1 (4.8)	0 (0.0)	

^aP-value ≤ 0.05 was obtained through the Chi-squared Test (Pearson p-value). ^b Information were obtained from 85 combat athletes and 80 handball athletes. ^c Information were obtained 81 handball athletes

most affected site (Table 1) and water polo sport with a higher prevalence of this injury (Fig. 1b).

The Table 2 shows the multivariate logistic regression model used to identify the factors associated with tendinopathy and joint and muscle injuries regardless of sport group.

Discussion

High prevalence of and risks associated with MSK-I have been gaining attention in sports medicine due to the negative impact on health and athletic performance [8]. Some sports leagues have proposed a definition for MSK-I that as a medically diagnosed physical complaint sustained while undertaking competition or training that has been accepted by some sports unions [14, 15]. In the present study, there was a high prevalence of MSK-I (76%) among Brazilian rugby, soccer, combat, handball and water polo athletes, and 19% reported a history of tendinopathy and joint and muscle injuries in combination. Our result is in agreement with that of Graças and colleagues, who observed a prevalence of 82.6% of MSK-I in Brazilian jiu-jitsu athletes [16]. In addition, 65% of first division soccer athletes showed some MSK-I type during the season [17], and 58% of university athletes from fifteen different sports had at least one injury at the end of the sports season [18]. The accumulation of MSK-I makes athletes less tolerant of hard training and therefore less likely to achieve higher goals, in addition to the serious problems they present for sports medical teams [19]. MSK-Is also generate high economic costs

due to performance loss and diagnosis and treatment of the injuries, affecting the athlete and the sports team [20].

The prevalence/incidence of types and locations, causes, and characteristics of MSK-Is varies according to sport modality [8, 21, 22]. In the present study, there were significant differences in the prevalence of the type and location of tendinopathy and joint and muscle injuries according to sport groups. Rugby involves a high volume of running and cutting and turning movements with high speed. It also involves serious direct trauma causing severe joint injuries in the ankle, shoulder and knee muscles or tendons [19, 23]. Due to this, in the present study, we observed a high frequency of injury in the ankles and shoulders of rugby athletes. Soccer is a team sport with intense movements such as cutting, jumping, fast running and ball kicking [20, 24]. Dönmez and colleagues observed that posterior thigh muscle fatigue and patellar tendon overuse were the most common injuries in Turkish soccer athletes [21], which corroborates the high frequency of posterior thigh muscle injuries and knee tendinopathy in the present study. Combat sports involve direct body contact with an opponent through a strike, kick and/or throw, which is reflected in the high frequency of joint injuries. For instance, judo and wrestling athletes are more likely to incur upper limb injuries due to the blows of pulls and holding the opponent, while taekwondo athletes are more susceptible to lower limb injuries because of kicks [8, 25]. In the present study, joint injury was more prevalent, mainly in the knee and shoulder, in combat

Table 2 Associated factors with joint injury, muscle injury and tendinopathy from logistic regression model

Variables	Control n = 141 n (%)	Joint injury n = 345 n (%)	OR adjusted ^a (CI 95%)	Muscle injury n = 300 n (%)	OR adjusted ^b (CI 95%)	Tendinopathy n = 190 n (%)	OR adjusted ^c (CI 95%)
Age (years)							
< 20	50 (35.5)	48 (13.9)	1 ^d	47 (15.7)	1 ^d	28 (14.7)	1 ^d
20 to 24	52 (36.9)	120 (34.8)	2.39 (1.42–4.02)	91 (30.3)	1.95 (1.14–3.33)	61 (32.1)	2.11 (1.14–3.92)
25 to 29	24 (17.0)	98 (28.4)	4.08 (2.21–7.51)	83 (27.7)	3.60 (1.94–6.69)	57 (30.0)	4.02 (2.02–8.01)
≥ 30	15 (10.6)	79 (22.9)	5.22 (2.55–10.67)	79 (26.3)	4.95 (2.42–10.09)	44 (23.2)	4.14 (1.85–9.26)
Sex							
Female	57 (40.4)	147 (42.6)	1 ^d	118 (39.3)	1 ^d	82 (43.2)	1 ^d
Male	84 (59.6)	198 (57.4)	0.98 (0.62–1.53)	182 (60.7)	1.02 (0.64–1.63)	108 (56.8)	0.80 (0.47–1.35)
Height (centimeters)							
< 165	33 (23.4)	75 (21.7)	1 ^d	51 (17.0)	1 ^d	36 (19.0)	1 ^d
165 to 174	45 (31.9)	118 (34.2)	1.12 (0.63–2.02)	91 (30.3)	1.13 (0.60–2.11)	66 (34.7)	1.08 (0.55–2.13)
175 to 184	34 (24.1)	99 (28.7)	1.28 (0.70–2.34)	103 (34.3)	1.78 (0.93–3.34)	57 (30.0)	1.29 (0.64–2.60)
≥ 185	29 (20.6)	53 (15.4)	0.84 (0.43–1.63)	55 (18.4)	1.19 (0.59–2.41)	31 (16.3)	0.79 (0.37–1.73)
Alcohol consumption ^e							
No	60 (42.6)	137 (39.8)	1 ^d	110 (37.0)	1 ^d	60 (31.9)	1 ^d
Yes	81 (57.4)	207 (60.2)	0.97 (0.62–1.50)	187 (63.0)	1.05 (0.68–1.65)	128 (68.1)	1.30 (0.79–2.15)
Smoking ^f							
No	134 (95.0)	317 (92.2)	1 ^d	275 (92.0)	1 ^d	173 (91.1)	1 ^d
Yes	7 (5.0)	27 (7.8)	1.42 (0.57–3.53)	24 (8.0)	1.39 (0.54–3.56)	17 (8.9)	1.91 (0.72–5.07)
Sport group							
Rugby	55 (39.0)	137 (39.7)	1 ^d	96 (32.0)	1 ^d	71 (37.4)	1 ^d
Soccer	38 (27.0)	83 (24.1)	0.70 (0.36–1.39)	85 (28.3)	1.03 (0.52–2.05)	47 (24.7)	0.70 (0.31–1.60)
Combat	14 (9.9)	66 (19.1)	1.33 (0.60–2.93)	40 (13.4)	1.18 (0.50–2.76)	22 (11.6)	0.74 (0.28–1.95)
Handball	13 (9.2)	29 (8.4)	0.56 (0.24–1.31)	55 (18.3)	1.73 (0.78–3.82)	18 (9.5)	0.51 (0.19–1.35)
Water polo	21 (14.9)	30 (8.7)	0.45 (0.21–0.96)	24 (8.0)	0.59 (0.27–1.31)	32 (16.8)	0.77 (0.33–1.79)
Years of training							
0 to 5	47 (33.3)	85 (24.6)	1 ^d	62 (20.7)	1 ^d	40 (21.1)	1 ^d
6 to 10	46 (32.6)	101 (29.3)	1.13 (0.65–1.96)	81 (27.0)	1.15 (0.64–2.06)	55 (28.9)	1.39 (0.72–2.67)
> 10	48 (34.1)	159 (46.1)	1.27 (0.71–2.26)	157 (52.3)	1.56 (0.87–2.81)	95 (50.0)	1.65 (0.85–3.21)
Weekly training hours							
0 to 7	42 (29.8)	88 (25.5)	1 ^d	68 (22.7)	1 ^d	44 (23.1)	1 ^d
8 to 14	55 (39.0)	131 (38.0)	1.03 (0.60–1.76)	125 (41.6)	1.21 (0.69–2.10)	68 (35.8)	0.98 (0.53–1.83)
15 to 21	32 (22.7)	82 (23.8)	1.19 (0.63–2.24)	69 (23.0)	1.17 (0.61–2.23)	52 (27.4)	1.48 (0.73–3.00)
> 21	12 (8.5)	44 (12.7)	1.59 (0.71–3.60)	38 (12.7)	1.63 (0.72–3.70)	26 (13.7)	1.67 (0.68–4.10)

OR is Odds ratio, CI is confidence interval. ^aOR adjusted by Age, Sport group, Years of training and Weekly training hours. ^bOR adjusted by Age, Height, Smoking, Sport group and Years of training. ^cOR adjusted by Age, Drinking alcohol, Smoking, Sport group, Years of training and Weekly training hours. ^dReference value.

^eInformation were obtained from 344 athletes from joint injury group, 297 athletes from muscle injury group and 188 athletes from tendinopathy group.

^fInformation were obtained from 344 athletes from joint injury group and 299 athletes from muscle injury group

athletes. Handball is a high-intensity sport, involving interaction with opponents and performing different intense body movements, such as overhead throwing [26, 27]. The prevalence of injuries in the ankle and knee joint and posterior thigh muscle found in our study can be explained by the dynamics of spin acceleration and

jumping and landing tasks with only one foot [26, 28]. Water polo is a team and contact sport with dynamic movements without the contribution of a solid base of support, which may cause micro-tears of the musculoskeletal structures, mainly the shoulder tendon, due to repetitive throwing movements [29–31]. In the present

study, the prevalence of shoulder tendinopathy was in agreement with that observed by Hams and colleagues in Australian water polo athletes [29].

According to sports modality, multiple factors can be associated with the prevalence of injuries in athletes [1, 8, 22]. Despite the differences in dynamics, logic, mechanisms, goals and training style of various sports, studies have been shown non-modifiable and modifiable risks associated with the prevalence of types and locations of MSK-I in athletes [1, 23, 30]. In the present study, only advanced age was a non-modifiable factor associated with MSK-I, regardless of the sport group. Self-reported musculoskeletal injury prevalence, depending on the study design factors and the age of the study population, varies from 2 to 65%. Age-adjusted logistic regression analyses have shown that athletes who train more than 2 h per day are 2 to 3.5 times more likely to develop an MSK-I, mainly in sports involving overuse or repetitive movements [32]. In addition, this result is in consonance with a Brazilian study, which observed a higher occurrence of MSK-I in jiu-jitsu athletes aged 30 years or more [16], and with the study of Snodgrass and colleagues, in which age was associated with muscle-tendon injury history in the neck in Australian rugby union players [33]. This can support further analytical studies by creating surveillance programmes to increase the career duration of athletes.

The risk of recall bias in self-report questionnaires and the lack of information regarding life habits are limitations of our study. In addition, this is a cross-sectional study and does not allow us to distinguish whether the exposure came before or after the observed outcome. However, a strength of our study is the relevant sample size and quality of questionnaire answers due to the high frequency of university education among the athletes. In addition, at the end of data collection, a trained observer checked the questionnaire with each athlete, and the database was double-checked by different trained researchers.

Conclusion

There is a high prevalence of tendinopathy and joint and muscle injuries among Brazilian rugby, soccer, combat sports, handball and water polo athletes. The MSK-I (type and site) prevalence was significantly different among the five sports groups. Older age was associated with tendinopathy and joint and muscle injuries regardless of the sport group, with an approximate 4–5-fold increased risk for athletes ≥ 30 years of age. Modifiable or non-modifiable associated factors can encourage analytical studies on injury surveillance with evident information on the type, location and severity of injuries among sports. Together, this information can contribute to implementing surveillance programmes to prevent MSK-Is.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12891-020-3141-8>.

Additional file 1: Questionnaire. Musculoskeletal injuries report for Brazilian athletes.

Abbreviations

95% CI: 95% Confidence Interval; χ^2 : Chi-square; BMI: Body mass index; IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; MSK-I: Musculoskeletal Injuries; OR: Odds ratios; SD: Standard deviation

Acknowledgments

The authors thank the support of Sports Trauma Center of National Institute of Traumatology and Orthopaedics (INTO), Sports Training Center and National or State Sports Championships for an opportunity to recruit athletes. And the technical assistance of Ana Carolina Leocadio de Souza, Camilli Gomes Pereira, Jade Pires do Nascimento and Victor Soares Wainchtock from Research Laboratory of Pharmaceutical Sciences, West Zone State University (UEZO) and INTO. We are grateful for support from Print Flocruz-CAPEs Program.

Authors' contributions

RAG, LRL and JAP participated in conception and design of study. RAG, LRL, VRAC, VARM, ONC, RCB, LAMD and JAP collated the data and developed the database. LRL performed the statistical analysis. LRL and JAP analysis and interpretation of data. LRL, VRAC, VARM and JAP wrote the manuscript. RAG, JAMG, JAG and JAP critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by the Brazilian agency Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, Brazil. Funding body contributed to acquisition of research inputs.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, Brazil (protocol number 2.455.630/2017). All participating provided written informed consent.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Centro de Trauma do Esporte, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Rio de Janeiro, Brazil. ²Research Division, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Avenida Brasil, 500, Rio de Janeiro, RJ 20940-070, Brazil. ³Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil. ⁵Escola de Educação Física e Desportos (EEFD), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Received: 5 December 2019 Accepted: 17 February 2020

Published online: 24 February 2020

References

1. Lisman PJ, de la Motte SJ, Gribbin TC, et al. A systematic review of the association between physical fitness and musculoskeletal injury risk: part 1- cardiorespiratory endurance. *J Strength Cond Res.* 2017;31(6):1744–57.

2. Attenborough AS, Hiller CE, Smith RM, et al. Chronic ankle instability in sporting populations. *Sports Med*. 2014;44(11):1545–56. <https://doi.org/10.1007/s40279-014-0218-2>.
3. Doherty C, Delahunty E, Caulfield B, et al. The incidence and prevalence of ankle sprain injury: a systematic review and meta-analysis of prospective epidemiological studies. *Sports Med*. 2014;44(1):123–40. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0102-5>.
4. Ekstrand J, Häggglund M, Waldén M. Epidemiology of muscle injuries in professional football (soccer). *Am J Sports Med*. 2011;39(6):1226–32. <https://doi.org/10.1177/0363546510395879>.
5. Tahirbegolli B, Dinçer Ş, Gözübüyük ÖB, et al. Athlete presentations and injury frequency by sport at a sports medicine university clinic. *J Sports Med Phys Fitness*. 2018;58(11):1676–80.
6. Hopkins C, Fu SC, Chua E, et al. Critical review on the socio-economic impact of tendinopathy. *Asia Pac J Sports Med Arthrosc Rehabil Technol*. 2016;4:9–20. <https://doi.org/10.1016/j.asmart.2016.01.002>.
7. Casals M, Finch CF. Sports biostatistician: a critical member of all sports science and medicine teams for injury prevention. *Inj Prev*. 2016;23(6):423–7. <https://doi.org/10.1136/injuryprev-2016-042211>.
8. Bromley SJ, Drew MK, Talpey S, et al. A systematic review of prospective epidemiological research into injury and illness in Olympic combat sport. *Br J Sports Med*. 2018;52(11):8–16. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2016-097313>.
9. Salles JI, Duarte ME, Guimarães JM, Lopes LR, Vilarinho Cardoso J, Aguiar DP, et al. Vascular endothelial growth factor Receptor-2 polymorphisms have protective effect against the development of tendinopathy in volleyball athletes. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167717>.
10. Salles JI, Lopes LR, Duarte MEL, Morrissey D, Martins MB, Machado DE, et al. Fc receptor-like 3 (–169T>C) polymorphism increases the risk of tendinopathy in volleyball athletes: a case control study. *BMC Med Genet*. 2018;19(1):119. <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0633-6>.
11. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. 2011;6(2):e17063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017063>.
12. Global Tobacco Surveillance System Collaborating Group. Global Tobacco Surveillance System (GTSS): purpose, production, and potential. *J Sch Health*. 2005;75:15. <https://doi.org/10.1111/j.1746-1561.2005.tb00004.x>.
13. Voskoboinik A, Prabhu S, Ling LH, et al. Alcohol and atrial fibrillation: a sobering review. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(23):2567–2576. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.08.074>.
14. Fuller CW, Molloy MG, Bagate C, et al. Consensus statement on injury definitions and data collection procedures for studies of injuries in rugby union. *Br J Sports Med*. 2007;41(5):328–31.
15. Fuller CW, Ekstrand J, Junge A, Andersen TE, Bahr R, Dvorak J, Häggglund M, McCrory P, Meeuwisse WH. Consensus statement on injury definitions and data collection procedures in studies of football (soccer) injuries. *Br J Sports Med*. 2006;40(3):193–201. <https://doi.org/10.1136/bjsm.2005.025270>.
16. Graças D, Nakamura L, Barbosa FSS, et al. Could current factors be associated with retrospective sports injuries in Brazilian jiu-jitsu? A cross-sectional study. *BMC Sports Sci Med Rehabil*. 2017;9:16. <https://doi.org/10.1186/s13102-017-0080-2>.
17. Reis GF, Santos TR, Lasmar RC, et al. Sports injuries profile of a first division Brazilian soccer team: a descriptive cohort study. *Braz J Phys Ther*. 2015; 19(5):390–7. <https://doi.org/10.1590/bjpt-rbf.2014.0120>.
18. Asperti AM, Fernandes TL, Pedrinelli A, et al. Sports injuries among amateur athletes at a Brazilian university. *Acta Ortop Bras*. 2017;25(2):93–8. <https://doi.org/10.1590/1413-785220172502165651>.
19. Toohey LA, Drew MK, Finch CF, et al. A 2-year prospective study of injury epidemiology in elite Australian Rugby sevens: exploration of incidence rates, severity, injury type, and subsequent injury in men and women. *Am J Sports Med*. 2019;47(6):1302–11. <https://doi.org/10.1177/0363546518825380>.
20. Yard EE, Schroeder MJ, Fields SK, et al. The epidemiology of United States high school soccer injuries, 2005–2007. *Am J Sports Med*. 2008;36(10):1930–7. <https://doi.org/10.1177/0363546508318047>.
21. Dönmez G, Korkusuz F, Özçakar L, et al. Injuries among recreational football players: results of a prospective cohort study. *Clin J Sport Med*. 2017;28(3): 249–54. <https://doi.org/10.1097/JSM.0000000000000425>.
22. Junge A, Langevoort G, Pipe A, et al. Injuries in team sport tournaments during the 2004 Olympic games. *Am J Sports Med*. 2006;34(4):565–76. <https://doi.org/10.1177/0363546505281807>.
23. Cruz-Ferreira A, Cruz-Ferreira E, Santiago L, et al. Epidemiology of injuries in senior male rugby union sevens: a systematic review. *Phys Sportsmed*. 2017; 45(1):41–8. <https://doi.org/10.1080/00913847.2017.1248224>.
24. Ekstrand J, Häggglund M, Waldén M. Injury incidence and injury patterns in professional football: the UEFA injury study. *Br J Sports Med*. 2011;45(7):553–8. <https://doi.org/10.1136/bjsm.2009.060582>.
25. Noh JW, Park BS, Kim MY, et al. Analysis of combat sports players' injuries according to playing style for sports physiotherapy research. *J Phys Ther Sci*. 2015;27(8):2425–30. <https://doi.org/10.1589/jpts.27.2425>.
26. Asker M, Waldén M, Källberg H, et al. A prospective cohort study identifying risk factors for shoulder injuries in adolescent elite handball players: the Karolinska handball study (KHASt) study protocol. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017;18(1):485. <https://doi.org/10.1186/s12891-017-1852-2>.
27. Mónaco M, Rincón JAG, Ronsano BJM, et al. Injury incidence and injury patterns by category, player position, and maturation in elite male handball elite players. *Biol Sport*. 2018;36(1):67–74. <https://doi.org/10.5114/biolSport.2018.78908>.
28. Giroto N, Hespagnol Junior LC, et al. Incidence and risk factors of injuries in Brazilian elite handball players: a prospective cohort study. *Scand J Med Sci Sports*. 2015;27(2):195–202. <https://doi.org/10.1111/sms.12636>.
29. Hams A, Evans K, Adams R, et al. Epidemiology of shoulder injury in sub-elite level water polo players. *Phys Ther Sport*. 2019;35:127–32. <https://doi.org/10.1016/j.pts.2018.12.001>.
30. Miller AH, Evans K, Adams R, et al. Shoulder injury in water polo: a systematic review of incidence and intrinsic risk factors. *J Sci Med Sport*. 2018;21(4):368–77. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2017.08.015>.
31. Webster MJ, Morris ME, Galna B. Shoulder pain in water polo: a systematic review of the literature. *J Sci Med Sport*. 2009;12(1):3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2007.05.014>.
32. Forde MS, Punnett L, Wegman DH. Prevalence of musculoskeletal disorders in union ironworkers. *J Occup Environ Hyg*. 2005;2:203–12. <https://doi.org/10.1080/15459620590929635>.
33. Snodgrass SJ, Osmotherly PG, Reid SA, et al. Physical characteristics associated with neck pain and injury in rugby union players. *J Sports Med Phys Fitness*. 2018;58(10):1474–81.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Instrumento de coleta do projeto “Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com o desenvolvimento de lesões musculoesqueléticas em atletas”

Data da aplicação: ____/____/____

ID° _____

Amostra Biológica: () Saliva () Sangue

Nome: _____

Cidade que reside: _____

Telefone: _____ E-mail: _____

Sexo: () M () F Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____ anos

Peso: _____ kg Altura: _____ m

Cor da pele segundo IBGE: () Branca () Parda () Preta
() Amarela () Indígena () Outros _____

Nível de escolaridade: () Fundamental () Médio () Superior

Renda familiar segundo IBGE: () A () B () C () D

Classe	Salários mínimos	Renda familiar (R\$)
A	Acima 20	R\$ 15.760,01 ou mais
B	10 a 20	De R\$ 7.880,01 a R\$ 15.760,00
C	4 a 10	De R\$ 3.152,01 a R\$ 7.880,00
D	2 a 4	De R\$ 1.576,01 a R\$ 3.152,00

Faz uso de bebida alcoólica? () Não () Sim, tempo _____ anos

Qual a frequência do uso de bebida alcoólica? () Baixa () Moderada () Alta

Você fuma? () Não () Sim, tempo _____ anos

- Número de cigarros? _____ por () dia / () semana
- Cigarros enrolados à mão _____ por () dia / () semana
- Cigarro de cravo (kreteks) _____ por () dia / () semana
- Cachimbos _____ por () dia / () semana
- Charutos ou cigarrilha _____ por () dia / () semana
- Número de sessões de cachimbos d'água/narguilé? _____ por () dia / () semana
- Outros? Qual? _____ por () dia / () semana

CARACTERÍSTICAS DO ATLETA: () Atleta () Ex-atleta

Nível competitivo: () Federado / Profissional () Não-federado

() Universitário / Escolar () Recreacional

Membro Dominante: () Direito () Esquerdo () Ambos

Esporte praticado: _____

Posição/função no esporte: _____

Idade iniciou a prática desse esporte? _____ anos. **Anos de treino:** _____

Local de Treino: () Praia () Quadra () Grama () Outros _____

Tipo de piso: () Rígido () Flexível () Areia () Outros _____

O treinamento no esporte é (era) preparado por quem?

() Professor de educação física () Jogador profissional () Outros _____

Faz ou fez acompanhamento nutricional? () Não () Sim

Realiza aquecimento prévio antes dos treinamentos ou jogos? () Não () Sim

Quantas horas por semana realiza atividade física (treinos, corrida, academia)? _____ horas.

Sente dor nos músculos após atividade física? () Não () Sim, local _____

Faz uso de algum medicamento contínuo? () Não () Sim, quais _____

Possui alguma doença autoimune? () Não () Sim, qual _____

HISTÓRICO DE LESÃO NO SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO (músculo, articulação, tendão ou ligamento) () Não () Sim

1. LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA () Não () Sim

Qual tipo de lesão muscular traumática? () Contusão () Estiramento

() Laceração / Ruptura muscular () Outros, qual _____

Número de lesão muscular traumática: () Até 3 () 4 a 9 () 10 a 15 () > 15

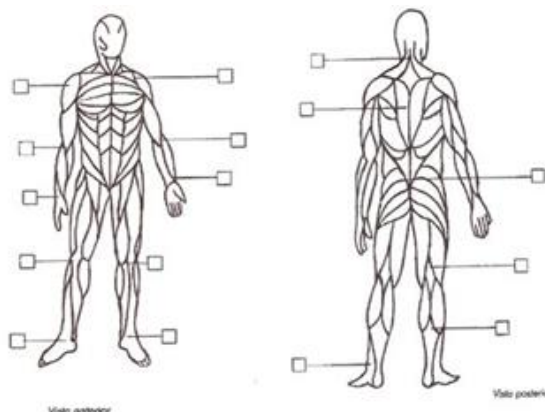
Local da lesão muscular traumática: Músculos Membros Superiores: () Não () Sim

() Braço anterior (Bíceps) () Braço posterior (Tríceps) () Antebraço anterior

() Antebraço posterior () Ombro (Manguito rotador) () Abdomen

Músculos Membros inferiores: () Não () Sim

- () coxa anterior (quadríceps) () coxa posterior (bíceps, semitendíneo, semimembranoso)
 () perna anterior (tibial anterior) () perna posterior - panturrilha (gastrocnêmio, solear)
 () perna medial (tibial posterior) () perna lateral (fibulares)
 () quadril anterior (psoas) () quadril lateral (glúteo médio, mínimo)
 () quadril posterior (gluteo máximo)



Idade da primeira lesão muscular traumática: _____ anos

Teve diagnóstico da lesão muscular traumática: () Não () Sim

Diagnóstico médico da lesão muscular traumática: _____

() exame de imagem (ultrassonografia, ressonância magnética, raio X)

Ficou afastado de treinamentos e/ou jogos devido a lesão muscular traumática: () Não () Sim

Tempo de afastamento devido a lesão muscular traumática: _____ dias

Método para tratamento da lesão muscular traumática: () Repouso () Imobilização ()
Fisioterapia

() Medicação. Qual? _____

() Cirurgia. Qual? _____

() outros _____

2. TENDINOPATIA () Não () Sim (tendinite)

Local da tendinopatia: () Ombro () Joelho () Calcâneo () Outros _____

Sente dor no tendão que tem tendinopatia? () Não () Sim

Ficou afastado de treinamentos e/ou jogos devido a tendinopatia: () Não () Sim

Tempo de afastamento devido a tendinopatia: _____ dias

Número de episódios de lesão no tendão: () Até 3 () 4 a 9 () 10 a 15 () > 15

Método para tratamento da tendinopatia: () Repouso () Imobilização () Fisioterapia

() Medicação. Qual? _____

() Cirurgia. Qual? _____

() outros _____

Diagnóstico médico da tendinopatia: _____

() exame de imagem (ultrassonografia, ressonância magnética, raio X).

3. LESÃO NO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA): () Não () Sim

Quantas vezes teve lesão no LCA do mesmo joelho? () 1 () 2 ou mais

Se lesionou quando estava: () Treinando () Competindo

A lesão no LCA foi: () traumática () sem contato

Já operou o joelho para Reconstrução do LCA? () Não () Sim . **Quantas vezes?**

Se já operou o LCA, qual enxerto foi utilizado? () Flexor (Semitendão e Gracil) () Patelar

() Banco de Tecidos () Outros _____

Ficou afastado de treinamentos e/ou jogos devido a lesão do LCA: () Não () Sim

Tempo de afastamento devido a lesão do LCA ou a cirurgia?: _____ meses

Se não operou o LCA, qual tratamento utilizado: () Repouso () Imobilização () Fisioterapia

() Medicação. Qual? _____

() outros _____

4. LESÃO EM ARTICULAÇÃO: () Não () Sim (lesão)

Articulações: () ombro () cotovelo () punho () mão () quadril () joelho

() tornozelo () pé () outros _____

Sente dor na articulação lesionada? () Não () Sim

Ficou afastado de treinamentos e/ou jogos devido a lesão na articulação: () Não () Sim

Tempo de afastamento devido a lesão na articulação: _____ dias

Número de lesões na articulação: () Até 3 () 4 a 9 () 10 a 15 () > 15

Método para tratamento da lesão na articulação: () Repouso () Imobilização () Fisioterapia

() Medicação. Qual? _____

() Cirurgia. Qual? _____

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com o desenvolvimento de lesões traumáticas em atletas**. Você foi selecionado por ser um atleta ou ex-atleta, de competição, com histórico de lesões traumáticas relacionadas a prática do esporte e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Os objetivos deste estudo são avaliar a influências de polimorfismos genéticos em genes selecionados envolvidos com o desenvolvimento de lesões traumáticas relacionadas a prática do esporte.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder ao Questionário Demográfico e Clínico, que visa à obtenção de dados pessoais de identificação e informações demográficas e fornecer uma amostra de células da mucosa oral que serão coletadas com o auxílio de um cotonete estéril (swab) ou uma amostra de sangue coletada com material totalmente descartável.

Os riscos relacionados com sua participação não irão interferir no resultado do tratamento ou acompanhamento que você está realizando no INTO. Todas as etapas do ser acompanhamento no INTO serão as mesmas com ou sem a sua participação na pesquisa. Não há risco adicional se você participar desta pesquisa.

O benefício relacionado com a sua participação é que no futuro poderá ajudar a melhorar o diagnóstico e/ou tratamento de outros atletas com lesões relacionadas a prática do esporte.

As informações obtidas com a realização dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados da pesquisa serão divulgados de forma a não possibilitar sua identificação. O seu nome não será revelado ainda que informações do registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação. Os resultados quando forem divulgados serão identificados com siglas que não permitirão conhecer a sua identidade.

Este Termo foi redigido em três vias, sendo uma para o participante, outra para o pesquisador e uma para ser anexada ao prontuário do participante, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP. Você poderá esclarecer suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento através dos números dos telefones ou endereço de e-mail disponível neste Termo.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____



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

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO/MS.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ
CEP: 20940-070 Tel.: (21) 2134-5000/(21) 2134-5061 e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Participante da pesquisa: _____

Assinatura do participante da pesquisa

Pesquisador responsável pela aplicação do termo:

- Jamila Alessandra Perini Machado, PhD, Pesquisadora
 Rodrigo Gôes, Mestre, Pesquisador

Responsável pela aplicação do termo
Assinatura

Pesquisador responsável:

Jamila Perini
Endereço: Avenida Brasil, 500, 5º andar
Telefone: 2134-5499
e-mail: japerini@into.saude.gov.br

Assinatura do pesquisador responsável

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____.