

---

---

**GUSTAVO DE MELLO RIBEIRO PINTO**

**Associação entre o polimorfismo genético das metaloproteinases 1 e 13 e  
a rigidez articular pós-traumática do cotovelo**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências do Sistema  
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Amado Ferreira  
Neto

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010. A  
versão original está disponível na Biblioteca Central FMUSP)

**SÃO PAULO  
2020**

---

---

---

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pinto, Gustavo de Mello Ribeiro  
Associação entre o polimorfismo genético das  
metaloproteinases 1 e 13 e a rigidez articular pós-  
traumática do cotovelo / Gustavo de Mello Ribeiro  
Pinto. -- São Paulo, 2020.  
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Ciências do Sistema  
Musculoesquelético.  
Orientador: Arnaldo Amado Ferreira Neto.

Descritores: 1.Rigidez articular 2.Cotovelo  
3.Contratura capsular 4.Trauma 5.Metaloproteinases  
6.Polimorfismo genético

USP/FM/DBD-147/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo e Rosely, pelo carinho sempre inesgotável e pelo empenho em me mostrar o caminho certo a seguir tanto na minha vida pessoal quanto profissional.

Aos meus irmãos, Paula, Leonardo e Julia, pelo apoio imensurável em todos os momentos da minha vida.

À minha esposa, Giúlia, pelo suporte, compreensão e amor que me mantiveram firme nesta caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os pacientes que aceitaram participar da pesquisa contribuindo com a ciência.

Ao Dr. Alexandre Leme Godoy-Santos e à Prof. Maria Cristina Godoy dos Santos, na realização e efetivação do projeto.

Ao Dr. Arnaldo Amado Ferreira Neto, pela orientação e consolidação dos ensinamentos ao longo do estudo.

Ao Dr. Jorge Henrique Assunção, pela inspiração e idealização do trabalho, assim como pela paciência em inúmeras revisões da tese.

Ao Dr. Cesar Guglielmetti, na contribuição dos dados e organização dos tópicos.

Aos Drs. Eduardo Malavolta e Mauro Gracitelli, pelos constantes ensinamentos desde a época de minha especialização.

Aos Profs. Drs. Gilberto Luis Camanho, Olavo Pires de Camargo e Tarcísio E. P. de Barros Filho, pela oportunidade de realizar este trabalho no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Às secretarias Tânia Borges e Rosana Moreno da Costa pelo auxílio na pós-graduação.

À secretária Thais Vasquez, pela assistência durante todo o estudo.

*"Escreva algo que valha a pena ler ou  
faça algo que valha a pena escrever."*

***Benjamin Franklin***

## **NORMALIZAÇÃO ADOTADA**

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

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

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

Nome das estruturas anatômicas baseados na Terminologia Anatômica, aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia - CTA-SBA. 1ª ed. (Brasileira) São Paulo, Editora Manole; 2001.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5ª edição, 2009, elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo decreto nº 6583/2008.

Estrutura de apresentação dos dados baseada em: Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gøtzsche PC, Devereaux PJ, et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 2010;340:c869.

---

**SUMÁRIO**

	Abreviaturas, Símbolos e Siglas	
	Lista de Figuras	
	Lista de Tabelas	
	Resumo	
	Abstract	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
3.1	Epidemiologia e anatomia aplicada à rigidez do cotovelo após o trauma.....	7
3.2	Alterações articulares pós-traumáticas no cotovelo.....	8
3.2.1	Alterações macroscópicas e anatômicas da rigidez.....	8
3.2.2	Alterações microscópicas.....	9
3.3	Metaloproteinases da matriz.....	11
3.3.1	Metaloproteinase da matriz 1.....	12
3.3.2	Metaloproteinase da matriz 13.....	13
3.3.3	Metaloproteinases de matriz e a rigidez do cotovelo.....	14
3.4	Polimorfismo genético.....	15
3.4.1	Polimorfismo genético e as metaloproteinases.....	16
3.4.1.1	Polimorfismo genético e MMP-1.....	16
3.4.1.2	Polimorfismo genético e MMP-13.....	17
3.5	Genética em associação com retração e rigidez articular.....	18
3.5.1	Articulação do cotovelo.....	18

---

3.5.2	Outras articulações.....	19
<b>4</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
4.1	Desenho do estudo.....	23
4.2	Participantes e elegibilidade.....	23
4.3	Aprovação na comissão de ética e termo de consentimento....	24
4.4	Custos.....	25
4.5	Riscos.....	25
4.6	Variáveis analisadas.....	25
4.7	Obtenção de DNA.....	26
4.8	Extração de DNA.....	27
4.9	Reação de PCR.....	27
4.10	Determinação do genótipo.....	28
4.11	Eletroforese.....	29
4.12	Cálculo da amostra.....	30
4.13	Análise estatística.....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
5.1	Eletroforese.....	36
5.2	MMP-1.....	37
5.3	MMP-13.....	38
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
	<b>APÊNDICES</b>	

---



**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS**

A	Adenina
ADAMTs	Desintegrina e metaloproteinase com trombospondina
C	Citosina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
cm	centímetros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
Fibronectina ED-A	Fibronectina domínio extra - A
g	Gravidade
G	Guanina
HLA	Antígeno leucocitário humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-B1	Interleucina beta-1
mA	Miliampere
MEC	Matriz extracelular
ml	Mililitro
mm	milímetros
mM	Milimolar
MMP-1	Metaloproteinase da matriz-1
MMP-13	Metaloproteinase da matriz-13
MMP-8	Metaloproteinase da matriz-8

MMPs	Metaloproteinases da matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
SUS	Sistema único de saúde
T	Timina
TGF- $\beta$ 1	Fator de transformação do crescimento $\beta$ 1
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
W	Watts
$\alpha$ -SMA	alfa actina de músculo liso
$\mu$ l	Microlitro

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1 – Imagem do gel de eletroforese com os padrões de banda dos genótipos, após digestão enzimática, corados com GelRed® para MMP-1 na posição -1607 1G>2G (rs1799750)..... 36
- Figura 2 – Imagem do gel de eletroforese com os padrões de banda dos genótipos, após digestão enzimática, corados com GelRed® para MMP-13 na posição -77 A>G (rs2252070)..... 37

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Informações sobre as condições da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase.....	28
Tabela 2 – Informações sobre a representação dos alelos.....	29
Tabela 3 – Características gerais dos pacientes.....	35
Tabela 4 – Frequência do polimorfismo genético nas MMP-1 (rs1799750) e MMP-13 (rs2252070) nos grupos de casos e controles.....	38

## RESUMO

Pinto GMR. *Associação entre o polimorfismo genético das metaloproteínas da matriz 1 e 13 e a rigidez articular pós-traumática do cotovelo* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo; 2020.

**INTRODUÇÃO:** A rigidez articular do cotovelo após o trauma é uma complicação desafiadora na prática ortopédica. Sabemos que o processo inflamatório iniciado após o trauma pode resultar na contratura da cápsula devido à ação de miofibroblastos e das metaloproteínas da matriz 1 e 13 (MMP-1 e MMP-13) causando excesso de colágeno na matriz extracelular, e que fatores genéticos também podem estar envolvidos na etiologia da rigidez do cotovelo pós-traumática. Recentemente, estudo histoquímicos demonstraram elevação na quantidade de metaloproteínas e miofibroblastos nas cápsulas contraturadas do cotovelo, porém não sabemos se esse aumento da celularidade local ocorre devido ao trauma ou à influência genética. O objetivo desse estudo foi avaliar a relação do polimorfismo genético na região promotora dos genes das metaloproteínas de matriz 1 e 13 com a rigidez articular pós-traumática do cotovelo. O objetivo secundário, foi relacionar outros fatores de risco que possam influenciar na ocorrência da doença. **MÉTODOS:** Avaliamos 20 cotovelos com rigidez articular e 12 cotovelos sem rigidez. Foram incluídos pacientes com maturidade esquelética com história de trauma no cotovelo há mais de 6 meses evoluindo com rigidez articular e sem melhora com fisioterapia por no mínimo quatro meses. O ácido desoxirribonucleico (DNA) dos voluntários foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal. Os genótipos das MMP-1 e MMP-13 foram determinados utilizando as técnicas de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR e RFLP). **RESULTADOS:** Não encontramos diferença significativa na frequência dos genótipos e alelos entre os grupos controle e teste no polimorfismo da MMP-1 na posição -1607 G>2G (rs1799750) e da MMP-13 na posição -77 A>G (rs2252070). A imobilização prolongada se correlacionou positivamente com a ocorrência de rigidez do cotovelo já que o tempo que estes pacientes permaneceram imobilizados foi cerca de duas vezes maior do que no grupo sem rigidez do cotovelo ( $p=0,017$ ). **CONCLUSÃO:** O polimorfismo genético das MMP-1 e -13 não esteve associado à rigidez articular pós-traumática do cotovelo. Dentre os fatores de risco para a ocorrência da doença, a imobilização prolongada demonstrou exercer maior influência na rigidez articular após o trauma.

**Descritores:** Rigidez articular; Cotovelo; Contratura capsular; Trauma; Metaloproteínas; Polimorfismo genético.

## ABSTRACT

Pinto GMR. *The association between genetic polymorphism of the matrix metalloproteinases 1 e 13 and the posttraumatic elbow stiffness* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

**INTRODUCTION:** The posttraumatic elbow stiffness is a challenging complication in orthopedics practice. It is known that the inflammatory process initiated after the trauma may cause the contraction of capsules due to an action of myofibroblasts and metalloproteinases of matrix 1 and 13 (MMP-1 and MMP-13), resulting in an excess of collagen in the extracellular matrix and that genetic factors also may be involved in the etiology of post-traumatic elbow stiffness. Recently, a histochemical study showed an increase in the amount of metalloproteinases and myofibroblasts in contracted elbow capsules, but we do not know if this increase in local cellularity occurs due to trauma or genetic influence. The aim of this study was to evaluate the relationship between genetic polymorphism in the promoter region of the genes of matrix metalloproteinases 1 and 13 with post-traumatic joint stiffness of the elbow. The secondary objective was to list other risk factors that occurred in the occurrence of the disease.

**METHODS:** We evaluate 20 elbows with articular stiffness and 12 elbows without contracture. We selected patients with skeletal maturity with a history of elbow trauma for more than 6 months, evolving with joint stiffness and without improvement with physical therapy for at least four months. The Deoxyribonucleic acid (DNA) from volunteers was obtained from buccal mucosa epithelial cells. The MMP-1 and MMP-13 genotypes were used as polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) techniques. **RESULTS:** We did not find any significant difference in the frequency of genotypes and alleles between the control and test groups in the MMP-1 polymorphism at position -1607 G > 2G (rs1799750) and MMP-13 at position -77 A > G (rs2252070). Prolonged immobilization was positively correlated with the occurrence of elbow stiffness since the time these patients remained immobilized was about twice as long as in the group without elbow stiffness ( $p = 0.017$ ).

**CONCLUSIONS:** The genetic polymorphism of MMP-1 and -13 was not associated with post-traumatic joint stiffness of the elbow. Among the risk factors for the occurrence of the disease, prolonged immobilization has shown to have a greater influence on joint stiffness after trauma.

**Descriptors:** Articular rigidity; Elbow; Capsule contracture; Trauma; Metalloproteinases; Genetic polymorphism.

---

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1 INTRODUÇÃO**

A mobilidade do cotovelo é fundamental para o bom funcionamento do membro superior e para o posicionamento da mão no espaço<sup>1</sup>. Um arco de movimento de aproximadamente 100° (flexoextensão de 130° a 30°) é essencial para a maioria das atividades diárias, sendo que a perda de 50° na mobilidade do cotovelo pode acarretar até 80% de perda funcional<sup>2,3</sup>.

A rigidez articular do cotovelo pode ocorrer após traumatismo da articulação, que pode envolver desde lesões de partes moles (pele, cápsula, ligamentos, músculos e tendões) a lesões ósseas<sup>4</sup>. Essas causas são divididas em intrínsecas e extrínsecas à articulação. Acredita-se que a contratatura de partes moles, principalmente da cápsula articular, seja o principal fato para a rigidez, uma vez que, mesmo após a correta redução e estabilização da fratura, o cotovelo pode ficar rígido. Outra condição que também desempenha papel importante na rigidez do cotovelo é a imobilização articular prolongada<sup>5</sup>.

Com a intenção de prevenir a rigidez pós-traumática no tratamento das fraturas e luxações do cotovelo, após correta estabilização da lesão inicia-se a mobilização precoce da articulação. Porém, cerca de 10 a 15% dos cotovelos precisarão de algum tipo de liberação cirúrgica ao longo do tratamento<sup>6</sup>.

Após o trauma, iniciam-se eventos para o reparo tecidual. A sequência desses eventos pode ser dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação. Na primeira fase, células inflamatórias estimulam o desbridamento do local lesionado e, em seguida, fibroblastos migram para iniciar a próxima fase com deposição de colágeno para uma nova matriz extracelular (MEC)<sup>7,8</sup>. Os



fibroblastos, além do colágeno, também produzem melastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e metaloproteinases<sup>9</sup>. Alguns desses fibroblastos, ao serem estimulados por fator de crescimento (TGF- $\beta$ 1) e fibronectina ED-A, expressam  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), sendo denominados miofibroblastos que se ligam às fibrilas de colágeno causando encurtamento da matriz local<sup>3,10,11</sup>. A fase de remodelação é controlada pelas metaloproteinases (MMPs) que regulam a remoção de moléculas da matriz extracelular antiga formando uma nova matriz colagenosa<sup>12</sup>.

As MMPs são uma família de 24 endopeptidases zincodependentes capazes de degradar praticamente todos elementos da matriz extracelular. As MMPs são subdivididas de acordo com a sua principal atividade degradativa, como as collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) que são capazes de degradar praticamente todos os subtipos de colágeno. A atividade dessas enzimas é controlada, principalmente, através de inibidores proteicos teciduais denominados TIMPs. As MMPs e seus inibidores determinam a arquitetura da MEC<sup>13</sup>.

A expressão das MMPs é regulada em diferentes níveis incluindo a transcrição genética. O polimorfismo genético é uma variação na sequência dos nucleotídeos do DNA e está presente em mais de 1% da população<sup>14</sup>. Dentre essas variações a mais comum é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)<sup>15</sup>. Os SNPs afetam somente uma base (adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G) na sequência gênica. Alguns SNPs na região promotora dos genes das MMPs estão correlacionados a um aumento da atividade e produção dessas enzimas<sup>16,17</sup>.

Recentemente, alguns estudos histoquímicos da cápsula articular do cotovelo demonstraram aumento das MMPs, miofibroblastos, fator de transformação do crescimento-  $\beta$ 1 e colágenos do tipo 1 e 3 nas cápsulas dos cotovelos com rigidez. No entanto, não sabemos se a elevação dessas enzimas nas cápsulas contraturadas ocorre por influência do trauma ou de um fator genético, como já demonstrado na fisiopatologia da capsulite adesiva e da doença de Dupuytren.

Logo, o estudo dos genes que expressam as metaloproteinases pode ser importante para a melhor compreensão do processo de contratura da cápsula articular do cotovelo, assim como pode ajudar a identificar indivíduos susceptíveis a evoluírem com essa afecção e permitir a prevenção e intervenção precoce bem como a melhor compreensão da fisiopatologia da doença

---

## **2. OBJETIVOS**

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo primário do estudo foi avaliar a relação do polimorfismo genético na região promotora dos genes das metaloproteinases de matriz 1 e 13 com a rigidez articular pós-traumática do cotovelo.

O objetivo secundário foi relacionar outros fatores de risco que possam influenciar na ocorrência da doença.

---

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Epidemiologia e anatomia aplicada à rigidez do cotovelo após o trauma

**Cooney**<sup>18</sup>, em 1993, relata que a completa perda do arco de movimento do cotovelo ocorre em 5% das lesões traumáticas.

**Cohen et al.**<sup>19</sup>, em 2007, em um estudo sobre a avaliação biomecânica e estrutural da cápsula articular anterior contraturada, afirmam que dentre as 37 cápsulas estudadas não foi encontrada diferença nas características celulares em relação ao sexo.

**Keschner et al.**<sup>20</sup>, em 2007, em um artigo de revisão, descrevem a etiologia da rigidez do cotovelo separando-a em fatores intrínsecos (incongruência articular, corpos livres, anquiloses, aderências, sinovite e osteófitos) e extrínsecos (ossificação heterotópica, contratura capsular, muscular).

**Myden e Hildebrand**<sup>21</sup>, em 2011, estudam 25 pacientes com lesões do cotovelo, incluindo fraturas, luxação e rotura do bíceps distal. Essas lesões são mais incidentes no sexo masculino com média de idade de 46,8 anos. A taxa de rigidez articular após lesão traumática do cotovelo que precisou de liberação cirúrgica é de aproximadamente 12%.

**Hildebrand**<sup>6</sup>, em 2013, publica um levantamento epidemiológico realizado com a população canadense. Por ano, são registradas 12.000 fraturas ou luxações, diante desse registro, no mesmo período, são feitas 1.500 liberações

cirúrgicas do cotovelo. O autor ainda acrescenta que a faixa etária dos pacientes varia de 20 a 60 anos.

## **3.2 Alterações articulares pós-traumáticas no cotovelo**

### **3.2.1 Alterações macroscópicas e anatômicas da rigidez**

**Akeson et al.**<sup>22</sup>, em 1961, explicam que as articulações do úmero distal com a ulna e rádio proximais são a base óssea do cotovelo, e que o limite dos tecidos moles da articulação do cotovelo é a cápsula articular, mais fraca anteriormente e posteriormente.

**Gallay et al.**<sup>23</sup>, em 1993, relatam que a cápsula articular dos cotovelos rígidos tem a complacência de um sexto das cápsulas de cotovelos normais devido a alterações estruturais e biomecânicas tais como modificações no colágeno e hipertrofia capsular.

**Cohen et al.**<sup>19</sup>, em 2007, avaliam trinta e sete cápsulas anteriores de cotovelos rígidos e comparam com cotovelos não rígidos de cadáveres. Do ponto de vista morfológico, a espessura da cápsula variou de 0,5 mm para o grupo controle a 8 mm no grupo de casos. Todas as cápsulas contraturadas demonstraram espessamento tecidual com desorganização das fibras de colágeno.

**Lindhovius et al.**<sup>24</sup>, em 2007, afirmam que a etiologia da rigidez articular do cotovelo pós-traumática é multifatorial e inclui artrose, ossificação

heterotópica e falha de consolidação da fratura juntamente com a contratura dos tecidos moles ao redor do cotovelo.

**Nandi et al.**<sup>25</sup>, em 2009, mencionam que o cotovelo é uma articulação sinovial altamente estável, intolerante ao trauma, muito propensa à rigidez e à degeneração.

### 3.2.2 Alterações microscópicas

**Tomasek et al.**<sup>10</sup>, em 2002, em uma revisão sobre a função dos miofibroblastos no processo de cicatrização tecidual afirmam que essas células caracterizam-se pela expressão da  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e colágeno tipo I coordenadas pelo TGF- $\beta$ 1, o que significa que possuem papel na síntese da matriz extracelular e contração da ferida.

**Hildebrand et al.**<sup>26</sup>, em 2004, ratificam o achado de **Tomasek et al.**<sup>9</sup>, ao avaliarem a cápsula anterior do cotovelo de seis pacientes submetidos à liberação articular por rigidez pós-traumática e compararem com cotovelos de outros 6 pacientes sem contratura capsular. Ainda, acrescentam que alguns fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , decorina, e fibronectina ED-A) e células da matriz extracelular modulam a expressão da alfa-actina do músculo liso e a formação de miofibroblastos.

**Hildebrand et al.**<sup>27</sup>, em 2005, descrevem as alterações que ocorrem na cápsula articular anterior em pacientes com rigidez pós-traumática crônica do cotovelo, comparando-as com pares de doadores sem contratura. Observam que, no processo de rigidez, a cápsula torna-se espessa e há aumento na



quantidade de fibras de colágeno do tipo I, III e V, proteoglicanos e MMP 1, 2, 9, 13 e 15. Por outro lado, havia a diminuição na expressão normal do mRNA do TIMP-1, -2, e -4. O número proporcional de miofibroblastos estava aumentado na cápsula articular dos cotovelos que precisaram de liberação cirúrgica.

**Germisheid e Hildebrand**<sup>28</sup>, em 2006, comparam a expressão de mRNA  $\alpha$ -SMA e o número de miofibroblastos na cápsula articular posterior do cotovelo com rigidez pós-traumática em relação aos cotovelos sem rigidez de cadáveres doadores. Observam que a amplitude de flexoextensão dos cotovelos rígidos é inversamente proporcional ao número de miofibroblastos encontrados na cápsula, e também que a quantidade de miofibroblastos encontrados na cápsula anterior era maior do que na região posterior.

**Hildebrand et al.**<sup>29</sup>, em 2008, realizam um estudo experimental utilizando joelhos de coelhos que possuem a cápsula articular semelhante ao cotovelo humano. São avaliadas as cápsulas articulares do joelho de 18 coelhos com contratura, e comparadas com o joelho contralateral sem contratura do mesmo espécime. Os autores descrevem o início da fisiopatologia da contratura capsular pós-traumática e observam que as alterações celulares iniciam-se dentro das duas primeiras semanas após o trauma com o aumento de colágeno tipo I, II e III, das metaloproteinases 1 e 13, e TGF- $\beta$ 1; quando também já há redução dos inibidores de MMP 1, 2 e 3.

**Hildebrand**<sup>6</sup>, em 2013, comparam as alterações celulares encontradas na cápsula articular de cotovelos com rigidez pós-traumática submetidos à liberação cirúrgica, com a de doadores pareados sem contratura. Identificam aumento de até 5 vezes no número de miofibroblastos, assim como elevação de colágeno tipo I e III e metaloproteinases 1 e 13.

### 3.3 Metaloproteinases da matriz

**Gross e Lapierre**<sup>30</sup>, em 1962, descrevem um fator colagenolítico no tecido anfíbio vivo, capaz de degradar o colágeno em pH neutro e temperatura até 27°C, o que sugere que verdadeiros sistemas enzimáticos capazes de degradar o colágeno estejam presentes em determinados tecidos animais.

**Bauer et al.**<sup>31</sup>, em 1970, afirmam que as colagenases humanas são capazes de degradar o colágeno na forma fibrilar em pH e temperatura fisiológica. Essas enzimas são caracterizadas por sua capacidade de clivar a molécula de colágeno nativa sem romper sua estrutura helicoidal.

**Goldberg et al.**<sup>32</sup>, em 1986, codificam por completo a sequência do RNA de uma colagenase na pele humana.

**Shapiro**<sup>33</sup>, em 1998, relata que as metaloproteinases da matriz compreendem uma família de enzimas extracelulares importantes no desenvolvimento embrionário e crescimento, assim como no reparo e remodelamento tecidual.

**Nagase e Woessner**<sup>34</sup>, em 1999, em um artigo de revisão, afirmam que a ativação das MMPs é regulada por fatores de crescimento, hormônios e citocinas, e a atividade proteolítica é controlada por alfa2-macroglobulinas e inibidores de metaloproteinases. Os TIMPs (-1, -2, -3, -4) são os principais inibidores endógenos das MMPs.

**Visse e Nagase**<sup>35</sup>, em 2003, descrevem as MMPs como proteinases zincodpendentes que participam da degradação da matriz extracelular e funcionam como reserva biológica de fatores de crescimento. Os autores dividem as metaloproteinases da matriz em seis grupos de acordo o substrato

específico, sequência e domínio estrutural: collagenases (1, 8, 13 e 18), gelatinases (2 e 9), estromolisinas (3, 10 e 11), matrilisinas (7 e 26), metaloproteinases de membrana (14, 15, 16, 17, 24 e 25) e outras (12, 19, 20, 21, 22, 23, 27, 28).

### 3.3.1 Metaloproteinase da matriz 1

**Jeffrey et al.**<sup>36</sup>, em 1970, descrevem a MMP-1 como a primeira enzima de vertebrados capaz de degradar o colágeno nativo, obtida do útero de ratos no pós-parto. A enzima tem sua atividade máxima em pH neutro e irreversivelmente inibido pelo EDTA.

**Brinckerhoff e Matrisian**<sup>37</sup>, em 2002, relatam que no tecido adulto normal os níveis de MMP-1 são geralmente baixos. Porém, quando o nosso corpo enfrenta uma situação adversa como cicatrização de ferida ou remodelamento tecidual a expressão de MMP-1 torna-se elevada.

**Brinckerhoff e Vicenti**<sup>38</sup>, em 2002, discutem a relação da MMP-1 com a degradação do colágeno intersticial. Demonstram que na artrite reumatoide, as citocinas presentes na sinóvia articular, estimulam o aumento de MMP, que participam da destruição do colágeno presente no tecido conjuntivo articular.

**Zuo et al.**<sup>39</sup>, em 2002, em um estudo sobre fibrose pulmonar em humanos e ratos demonstram aumento da atividade de MMP-1, miofibroblastos e de genes codificadores dos colágenos I e III.

**Pardo e Selman**<sup>40</sup>, em 2005, relatam que a expressão da collagenase-1 é regulada por fatores de crescimento, hormônios e citocinas, e a atividade

proteolítica é precisamente controlada através de ativadores e inibidores como macroglobulinas e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs).

**Zeng et al.**<sup>41</sup>, em 2005, relatam que a trama de colágeno da cartilagem articular é feita principalmente de colágeno tipo II, que fornece elasticidade e deformabilidade a essa região, e que a MMP-1 pode degradar esse colágeno e exercer uma influência importante na fisiopatologia da osteoartrite.

### **3.3.2 Metaloproteinase da matriz 13**

**Freije et al.**<sup>42</sup>, em 1994, identificam e clonam o gene de uma nova metaloproteinase que tinha característica estrutural de uma colagenase, dando o nome de MMP-13 ou colagenase-3.

**Reboul et al.**<sup>43</sup>, em 1996, demonstram a participação da MMP-13 na fisiopatologia da osteoartrite, uma vez que essa colagenase tem altíssimo poder de degradação do colágeno tipo II, que está presente em maior quantidade na cartilagem hialina.

**Gomez et al.**<sup>44</sup>, em 1997, relatam que a atividade da metaloproteinase 13 é controlada por vários inibidores fisiológicos como  $\alpha$ 2-macroglobulinas e os inibidores teciduais de metaloproteinases.

**Knauper et al.**<sup>45</sup>, em 1997, chamam a atenção para o poder catalítico da MMP-13 também sobre a fibronectina e colágenos do tipo IV, IX, X e XIV.

**Fernandes et al.**<sup>46</sup>, em 1998, em um estudo experimental em cães com osteoartrite, mostram que, nas articulações, a MMP-13 está localizada

principalmente nas camadas intermediária e profunda da cartilagem, onde se tem maior quantidade de fibras colágenas do tipo II.

**Tardif et al.**<sup>47</sup>, em 2004, afirmam que a quantidade basal de metaloproteinase 13 no tecido normal é baixa, mas que sua expressão aumenta com a necessidade de remodelamento tecidual.

### **3.3.3 Metaloproteinases de matriz e a rigidez do cotovelo**

**Hildebrand et al.**<sup>27</sup>, em 2005, avaliam a cápsula anterior do cotovelo de onze pacientes com contratura crônica e comparam com 9 cotovelos sem rigidez. Concluem que, nas cápsulas contraturadas, os níveis de mRNA estavam aumentados para colágeno do tipo I, III e V, biglicano e MMP-1, -2, -9, -13 e -15.

**Cohen et al.**<sup>19</sup>, em 2007, colhem 37 cápsulas anteriores rígidas no momento da liberação cirúrgica e comparam com 7 cotovelos de cadáveres sem rigidez. Os autores encontram aumento das MMP-1, -2 e -3 nos cotovelos com contratura. Acrescentam, ainda, que as MMP-1 foram encontradas nos fibroblastos da membrana celular, nas células sinoviais e nos vasos sanguíneos.

**Hildebrand**<sup>6</sup>, em 2013, compara os achados na cápsula articular de cotovelos rígidos, em modelo animal, após trauma e imobilização prolongada, com cotovelos sem rigidez. Foram verificados níveis aumentados de mRNA para colágeno do tipo I e III e MMP-1 e -13 no grupo rigidez.

### 3.4 Polimorfismo genético

**Thompson et al.**<sup>14</sup>, em 1991, no livro “Genetics in Medicine”, afirmam que o polimorfismo genético é uma variação na sequência dos nucleotídeos do DNA, presente em pelo menos 1% da população, considerado biologicamente normal.

**Collins et al.**<sup>48</sup>, em 1998, reiteram que aproximadamente 90% dos polimorfismos do DNA são alterações isoladas de nucleotídeos que não alteram a função genética. Acrescentam que polimorfismos nas regiões codificadoras ou regulatórias dos genes teriam maior propensão a causar uma mutação funcional.

**Shapiro**<sup>33</sup>, em 1998, afirma que as metaloproteinases da matriz apresentam padrão genético similar, uma vez que os genes das colagenases, e de outra metaloproteinases (estromolisinas 1 e 2, matrilisinas e metaloelastase dos macrófagos), estão localizados no cromossomo 11q22.

**Sherry et al.**<sup>49</sup>, em 1999, relatam que o polimorfismo ocorre naturalmente na molécula de DNA na frequência média de um em cada 1.000 pares de bases em todo o genoma humano.

**Ye et al.**<sup>50</sup>, em 2000, informam que o polimorfismo exerce efeitos específicos na expressão gênica do alelo, influenciando em diferenças individuais dos traços biológicos e na susceptibilidade de determinadas doenças.

**Stoneking**<sup>51</sup>, em 2001, relata que o genoma humano tem cerca de 3,2 bilhões de nucleotídeos e estima que, ao comparar duas sequências de DNA humano, encontra-se um polimorfismo a cada 1000 a 2000 nucleotídeos. Logo, o número total de polimorfismos seria em torno de 1,6 a 3,2 milhões.

**Yan e Boyd**<sup>52</sup>, em 2007, em um artigo de revisão, reiteram que os polimorfismos do DNA ocorrem de forma natural e estão distribuídos pelo

genoma humano, e quando presentes na região promotora podem alterar a expressão gênica. Alguns polimorfismos podem acontecer em regiões reguladoras das metaloproteinases.

### **3.4.1 Polimorfismo genético e as metaloproteinases**

#### **3.4.1.1 Polimorfismo genético e MMP-1**

**Rutter et al.**<sup>17</sup>, em 1998, reportam o polimorfismo único de um nucleotídeo na posição -1607 da região promotora da MMP-1, onde uma guanina é adicionada à sequência. O alelo 2G (duas guaninas) está associado a um aumento da atividade de transcrição desse gene e da degradação da matriz extracelular.

**Jurajda et al.**<sup>53</sup>, em 2002, identificam um novo polimorfismo genético da collagenase 1 na região promotora do gene na posição -519 que consiste na substituição da guanina por adenosina, em pacientes com câncer colorretal.

**Massarotti et al.**<sup>54</sup>, em 2002, acham associação entre o polimorfismo da região promotora da MMP-1 e a gravidade da artrite reumatoide. Os autores diagnosticam a forma erosiva da doença em 7 pacientes e todos apresentam o alelo 2G. Além disso, o número de articulações acometidas era maior nos pacientes com genótipo 2G/2G e 1G/2G, em comparação com os portadores do genótipo 1G/1G.

**Godoy-Santos et al.**<sup>55</sup>, em 2009, demonstram que o polimorfismo na região promotora do gene da MMP-1 pode ser um fator de risco para a falência precoce do implante da artroplastia total do quadril.

**Planello et al.**<sup>56</sup>, em 2011, relatam ligação entre o polimorfismo do gene da metaloproteinase 1 e a degeneração da articulação temporomandibular em uma população de 23 indivíduos.

**Godoy-Santos et al.**<sup>57</sup>, em 2013, encontram forte associação entre o polimorfismo genético e a ocorrência de tendinite do tibial posterior. Os autores avaliam 150 pacientes e encontram relação entre a doença e o polimorfismo da MMP-1 na posição -1607.

**Assunção et al.**<sup>58</sup>, em 2017, relatam associação entre o polimorfismo genético da MMP-1 e a rotura completa do manguito rotador. Os autores demonstram que indivíduos com genótipo 1G/2G e 2G/2G foram mais suscetíveis à rotura do manguito rotador.

#### **3.4.1.2 Polimorfismo genético e MMP-13**

**Yoon et al.**<sup>59</sup>, em 2002, identificam duas variantes no gene da MMP-13, uma na posição -291 (inserção/deleção 11A/12A), e outra na posição -77 (substituição de adenina por guanina), que foram qualificadas como polimorfismo genético. Os autores relatam que a atividade transcricional do alelo A é duas vezes maior que do alelo G no SNP da MMP-13 na posição -77, e dessa forma, esse alelo intensifica a degradação da matriz extracelular com excessiva quebra



das fibras de colágeno tornando-se um fator de risco genético para a ocorrência de aterosclerose da aorta abdominal em negros jovens.

**Tannure et al.**<sup>60</sup>, em 2012, encontram uma correlação entre o polimorfismo genético da região promotora da metaloproteinase 13 com a ocorrência de cárie dentária.

**Vašků et al.**<sup>61</sup>, em 2012, associam o polimorfismo da MMP-13 com o diagnóstico de doença arterial coronariana e uma respectiva gravidade. Na avaliação de 1071 pacientes, os autores encontram associação da mutação com o número de estenoses e artérias afetadas confirmadas por coronariografia.

**Gao et al.**<sup>62</sup>, em 2014, em uma metanálise, concluem que o polimorfismo da região promotora -77 com a substituição de adenina por guanina é um fator de risco importante para o desenvolvimento e progressão de diversos tipos de câncer humano, especialmente o de pulmão.

**Munhoz et al.**<sup>63</sup>, em 2014, afirmam que os polimorfismos rs2252070 na região promotora do gene da MMP-13 (-77) estão associados à tendinopatia primária do tibial posterior e podem ser utilizados como fatores genéticos de risco para desenvolvimento de insuficiência no tendão.

### **3.5 Genética em associação com retração e rigidez articular**

#### **3.5.1 Articulação do cotovelo**

**Colomer et al.**<sup>64</sup>, em 2002, descrevem o caso de uma família com distrofia muscular de Emery-Dreifuss autossômica dominante geneticamente confirmada.

A doença é caracterizada pela tríade clínica de início precoce de contraturas dos cotovelos, tendões de calcâneos e coluna vertebral, debilitação e fraqueza com uma distribuição predominantemente umeroperoneal e defeitos de condução cardíaca e cardiomiopatia.

**Nesterenko et al.**<sup>65</sup>, em 2009, revisam 116 casos de rigidez refratária do cotovelo, e identificam um subgrupo de quatro pacientes que após trauma inespecífico, mesmo de baixa intensidade, desenvolvem contratura grave dos cotovelos resistente aos tratamentos propostos, o que poderia estar relacionado a uma predisposição genética.

### 3.5.2 Outras articulações

**Hu et al.**<sup>66</sup>, em 2005, mostram que a doença de Dupuytren (DD) estava presente em cinco gerações de uma família sueca que foi herdada de maneira autossômica dominante apresentando relação com os cromossomos 16.

**Laneuville et al.**<sup>67</sup>, em 2007, imobilizam o joelho de 40 ratos em flexão durante 4 semanas com o objetivo de provar que os fatores intrínsecos, mais do que a causa mecânica, seriam determinantes para a contratura. Os ratos eram de quatro raças diferentes com peso e idade semelhantes. Dentre os exemplares, duas raças apresentaram maior contratura indicando que fatores genéticos determinam a susceptibilidade ou resistência à contratura articular após estímulo ambiental.

**Ojwang et al.**<sup>68</sup>, em 2010, demonstram associação genética da doença de Dupuytren com os cromossomos 6, 11 e 16 em um estudo com quarenta pacientes de origem caucasiana com diagnóstico da doença.

**Michou et al.**<sup>69</sup>, em 2012, em um artigo de revisão sobre a genética na DD, relatam que as variações genômicas observadas na patologia incluem alterações no número de cópias de genes nas regiões 10q22, 16p12.1 e 17p12 dos cromossomos, associações com o alelo HLA-DRB1 \* 15 e uma mutação no rRNA 16s.

**Capstick et al.**<sup>70</sup>, em 2013, mostram que a doença de Dupuytren é mais comum em irmãs na faixa etária de 60 a 90 anos. Os autores concluem que os loci genéticos, atualmente conhecidos que predisõem ao Dupuytren, são responsáveis por 12,1% da hereditariedade total da doença.

**Xu et al.**<sup>71</sup>, em 2016, afirmam que o polimorfismo genético da MMP-3 aumenta a chance de desenvolver capsulite adesiva na população chinesa estudada, tornando-se um fator de risco genético importante.

**Prodromidis e Charalambous**<sup>72</sup>, em 2016, em uma revisão sistemática discutem a predisposição genética na capsulite adesiva. Os autores identificam a história familiar, raça branca e presença do antígeno HLA-B27 como marcadores de predisposição genética para a doença.

**Chen et al.**<sup>73</sup>, em 2017, avaliam quarenta e dois ombros com diagnóstico de capsulite adesiva primária e encontram associação entre o polimorfismo genético da IL-B1 com o aumento da ocorrência da doença.

**Malavolta et al.**<sup>74</sup>, em 2018, descrevem a etnia asiática como fator de risco independente para o desenvolvimento de capsulite adesiva com razão de chance de 3,6.

**Cohen et al.**<sup>75</sup>, em 2019, identificam que o polimorfismo genético das MMP-13 e -2 estão associados ao risco aumentado de desenvolver a capsulite adesiva. Os autores também afirmam que os polimorfismos que afetam o padrão de metilação do DNA, como os que ocorrem na região de ligação do fator de transcrição Sp1, aumentam a susceptibilidade à doença.

**Mann et al.**<sup>76</sup>, em 2019, provam que fatores biológicos como as MMPs, TIMPs e ADAMTs podem contribuir com a rigidez após artroplastia total do joelho. Os achados do estudo sugerem que a atividade das MMPs não é suficientemente balanceada pelos seus respectivos inibidores, estabelecendo um estado pró-fibrótico nesses pacientes com rigidez.

**Rodrigues et al.**<sup>77</sup>, em 2019, demonstram associação do polimorfismo genético da metaloproteinase da MMP-1 (posição - 1607) e da MMP-13 (posição -77) com a Moléstia de Dupuytren.

---

## **4. MÉTODOS**

## **4 MÉTODOS**

### **4.1 Desenho do estudo**

Foi realizado um estudo caso-controle. Foram selecionados pacientes com afecções traumáticas no cotovelo do Grupo de Ombro e Cotovelo do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, durante o atendimento ambulatorial.

### **4.2 Participantes e elegibilidade**

Avaliamos pacientes com maturidade esquelética e trauma inicial no cotovelo há mais de 6 meses que evoluíram com rigidez articular mesmo após terem realizado fisioterapia por no mínimo 4 meses. Consideramos, também, os pacientes com história de fratura prévia do cotovelo consolidada (incluindo o terço distal do úmero, extremidade proximal da ulna, extremidade proximal do rádio) e/ou luxação do cotovelo tratados tanto de modo cirúrgico como não cirúrgico. O grupo controle foi formado por pacientes com arco de movimento mínimo funcional (flexoextensão de 30° a 130°) e o grupo de casos por aqueles com arco de movimento de flexoextensão < 100°.

Não foram incluídos os pacientes com bloqueio articular (arco de movimento igual a 0°), pseudoartrose de fratura prévia, incongruência da articulação umeroulnar, presença de material de síntese intra-articular,

ossificação heterotópica e osteoartrose moderada ou grave do cotovelo (Tipo II e III segundo a classificação de **Rettig et al.**<sup>78</sup>). Além disso, não incluímos pacientes com infecção prévia ou em atividade no cotovelo e pacientes com antecedente de traumatismo cranioencefálico, lesão neurológica no membro, doenças sistêmicas autoimunes (lúpus, artrite reumatoide, artrite psoriática etc) ou doença mental com dificuldade para compreender os termos do trabalho e, por último, não foram incluídos pacientes com uso de imobilização no cotovelo por tempo maior que 1 mês.

#### **4.3 Aprovação na comissão de ética e termo de consentimento**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 15 de dezembro de 2016, como protocolo de pesquisa 1.867.709 (**Anexo A**).

A todos os pacientes selecionados foi explicado do que se trata a pesquisa por uma assistente de pesquisa não envolvida com o tratamento e oferecida a opção de participação ou não. Todos os participantes ou seus responsáveis legais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, que explica detalhadamente em termos leigos, os objetivos do trabalho, sendo assegurada a opção de abandonar a participação na pesquisa, sem prejuízo da assistência médica (**Apêndice 1**).

Este estudo foi realizado mediante parceria do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná e o Departamento de Ortopedia e

Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**Anexo B**).

#### **4.4 Custos**

O estudo não contou com auxílio financeiro de nenhum órgão de fomento à pesquisa. O tratamento dos pacientes foi custeado com verba própria do hospital, proveniente do SUS. O material necessário para obtenção do DNA e determinação dos genótipos da população estudada foi pago com verba regular do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná. Os pesquisadores não apresentam conflito de interesses.

#### **4.5 Riscos**

Não houve risco para a saúde dos pacientes ou pesquisadores relativos à pesquisa científica.

#### **4.6 Variáveis analisadas**

Foram coletados após a assinatura do termo de consentimento informado, por meio de um guia padronizado pelos pesquisadores, os seguintes dados dos pacientes (**Anexo C**):



- Idade;
- Sexo;
- Raça conforme a orientação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), exposta no sítio <http://www.ibge.gov.br>;
- Lado dominante;
- Lado acometido;
- Comorbidades clínicas;
- Mecanismo de trauma e tipo de trauma (baixa<sup>79</sup> e alta energia<sup>80</sup>);
- Tempo de imobilização total do cotovelo, se realizada;
- Tipo de tratamento realizado, cirúrgico ou não cirúrgico;
- Duração do tratamento fisioterápico;
- Se houver fratura: simples x cominutiva<sup>81</sup>.

#### **4.7 Obtenção de DNA**

O DNA dos pacientes foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, através de um bochecho com 3 ml de solução autoclavada de glicose a 3% (concentração isomolar com a saliva) durante 2 minutos. Nessa solução foram adicionados 1 ml de solução TNE (10 MM Tris pH 8, 150 MM NaCl e 2 mM EDTA). Para a suspensão das células, foi acrescido 1,3 ml de solução de extração (Tris-Cl a 10 mM, (pH 7,8), EDTA a 5 mM e SDS a 0,5%) e as amostras foram congeladas a -20°C até o momento de extração do DNA.

#### **4.8 Extração de DNA**

O estudo do polimorfismo genético foi realizado no Departamento de Biologia Celular da Universidade do Paraná conforme protocolo de **Aidar e Line**<sup>82</sup>. O grupo de pesquisadores que fez a análise genética do material coletado não tinha conhecimento de qual grupo o paciente fazia parte.

Depois de descongeladas, as amostras foram incubadas por 16 horas com 20 mg/mL de proteinase K (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) a 56°C. Foi adicionado 500 ul de solução de Acetato de Amônio 10mM com EDTA 1mM e turbilhonado por 5 segundos. Após centrifugação a 170000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e adicionado 540 ul de isopropanol para cada 900 ul da solução contendo DNA. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi submetido à lavagem com etanol a 70% e seco por 15 minutos a 37°C. O DNA foi ressuspenso em 100 ul de tampão TE (Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8), EDTA a 1 mM) em temperatura ambiente por 3 horas. A concentração do DNA genômico de cada amostra foi mensurada com o auxílio de um quantificador de DNA Nanodrop® (ThermoFisher Scientific Incorporation, Waltham, Massachusetts, USA) e sua pureza estimada pela razão de densidade óptica 260/280.

#### **4.9 Reação de PCR**

PCR (Polimerase Chain Reaction) foi utilizada para amplificação dos fragmentos das regiões reguladoras dos genes da MMP-1 e MMP-13. Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão por enzimas de restrição

para gerar fragmentos menores (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism). As sequências amplificadas (PCR) e digeridas (RFLP) foram analisadas por eletroforese em géis verticais de poliacrilamida a 10% em TBE 1x (89 mM de Tris-Borato, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA). Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 15 mA, sendo o tempo de corrida variável de acordo com o tamanho do fragmento. Os oligonucleotídeos iniciadores, a temperatura e o tempo de anelamento (amplificação) estão descritos na **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Informações sobre as condições da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase

SNP	Oligonucleotídeos Iniciadores	Temperatura e Tempo de Anelamento
MMP-1 (rs1799750)	F*: TCGTGAGAATGTCTTCCCATT R**: TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC	55°C 30s
MMP-13 (rs2252070)	F*: GATACGTTCTTACAGAAGGC R**: ACAAATCATCTTCATCACC	50°C 1m

°C: graus Celsius; s: segundos; m: minuto; F: oligonucleotídeo iniciador direto; MMP-1: metaloproteinase da matriz-1; MMP-13: metaloproteinase da matriz-13; R: oligonucleotídeo iniciador reverso; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único.

#### 4.10 Determinação do genótipo

Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão por enzimas de restrição para gerar fragmentos menores pela técnica de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição. A digestão foi realizada com o volume final de 15 µl, por 16 horas a 37°C.

O polimorfismo do gene da MMP-1 na posição -1607 foi caracterizado pela inserção de uma base guanina (G), criando dois alelos diferentes (1G ou 2G). O alelo 2G está relacionado com o aumento da expressão desse gene. A enzima de restrição XmnI reconheceu o alelo 1G e na presença deste o produto de PCR (118 pares de bases) e digeriu em duas partes (89 e 29 pares de bases). O alelo 2G não foi digerido por essa enzima de restrição, permanecendo como uma banda de DNA de 118 pares de bases. O polimorfismo do gene da MMP-13 na posição -77 foi caracterizado por uma troca de adenina (A) por guanina (G), criando dois alelos diferentes (A ou G). Esse polimorfismo esteve associado a uma alteração da atividade de transcrição: o alelo A tem aproximadamente duas vezes mais atividade de transcrição, do que o alelo G (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – Informações sobre a representação dos alelos

<b>SNP</b>	<b>RFLP</b>	<b>Pb PCR - RFLP</b>
MMP-1	XmnI/Pdml	118 (Alelo 2G)
(rs1799750)	37°	89 + 29 (Alelo G)
MMP-13	BsrI	445 (Alelo A)
(rs2252070)	65°C	197 + 248 (Alelo G)

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; MMP-1: metaloproteinase da matriz-1; MMP-13: metaloproteinase da matriz-13; RFLP: polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição; Pb PCR - RFLP: pares de base das sequências amplificadas e digeridas em reação de cadeia da polimerase; XmnI/Pdml/BsrI: enzimas.

#### 4.11 Eletroforese

As sequências amplificadas (PCR) e digeridas (RFLP) foram analisadas por eletroforese em gel horizontal de agarose 5% e tampão TBE (89 mM de Tris-

Borato, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA), colocadas no interior de uma cuba de 10 X 10 cm (Uniscience Corporation, Miami, Flórida, USA) e submetidas a uma corrente elétrica de 100 V; 120 mA e 60 W durante aproximadamente 30 minutos para confirmação da amplificação (PCR) e de 50 minutos para a corrida dos produtos da digestão (RFLP). Foram utilizados, respectivamente, o volume total de 5 µl da reação de PCR e 8 µl da reação de RFLP com 1,5 µl do reagente GelRed® (Biotium Incorporation, Fremont, Califórnia, USA). A visualização foi feita com transiluminador e a imagem foi capturada utilizando o programa DigiDoc GED® (DigiDoc Soluções, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil).

#### **4.12 Cálculo da amostra**

O cálculo da amostra utilizou um nível de significância de 5% e um poder de 80%. Até o presente momento, não há estudos sobre a relação do polimorfismo genético das MMPs e a rigidez pós-traumática do cotovelo. Utilizando a taxa de 25% do alelo 2G da MMP-1 no grupo controle e uma diferença esperada de 53% entre os grupos, foram necessários 32 indivíduos na amostra total. Esses números basearam-se em uma publicação de **Godoy-Santos et al.**<sup>57</sup>, que estudaram a associação do polimorfismo genético da MMP-1 com a tendinopatia do tendão tibial posterior e encontraram no grupo controle 25% do alelo 2G, enquanto no grupo de casos esse alelo esteve presente em 78% dos pacientes.

#### **4.13 Análise estatística**

Submetemos as variáveis contínuas à avaliação da normalidade, através do teste de Kolmogorov-Smirnov, e da homogeneidade, através do teste de Levene. As variáveis contínuas estão apresentadas por médias e desvio padrão, enquanto as categóricas em valor absoluto e percentual.

A comparação entre os casos e controles, no que diz respeito às diferentes variáveis, foi realizada pelos testes de Chi-quadrado ou exato de Fisher, nas variáveis categóricas. Nas variáveis contínuas, pelo teste T de Student, foi verificado se há distribuição paramétrica dos dados ou Wilcoxon se não paramétrica.

Foi avaliada a diferença da frequência dos alelos e genótipos das MMP-1 e 13 nos indivíduos com rigidez pós-traumática do cotovelo e controles pelo teste Chi-quadrado.

O programa ARLEQUIN v. 2.0<sup>83</sup> foi utilizado para a análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada.

Utilizamos para análise dos dados o programa SPSS versão 21.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois) e nível de significância de 5%.

---

## **5. RESULTADOS**

---

## 5 RESULTADOS

Avaliamos 32 pacientes, sendo 20 com rigidez pós-traumática do cotovelo e 12 sem rigidez. Não tivemos perdas de amostra durante a extração e genotipagem do DNA. Os casos e controles tinham média de idade de  $39,3 \pm 11$  e  $47,4 \pm 12,6$ , respectivamente ( $p = 0,068$ ). Quanto ao gênero, o grupo de casos foi formado por 14 pacientes (70%) do sexo masculino, enquanto no grupo controle tivemos seis homens e seis mulheres ( $p = 0,258$ ). Em relação à etnia, a raça branca teve maior incidência no grupo caso e controle ( $p = 0,566$ ).

Observamos, também, que o lado dominante foi afetado em metade dos pacientes do grupo de casos e 58,3% dos controles ( $p = 0,647$ ).

No grupo controle, oito pacientes tiveram traumas de baixa energia e 4 pacientes de alta energia que se dividiram em quedas (7), acidentes motociclísticos (2), acidente de bicicleta (1), acidente com skate (1) e acidente de carro (1). E no grupo de casos, foram 8 pacientes com acidentes de baixa energia, e doze pacientes com acidentes de alta energia ( $p = 0,273$ ) que se distribuíram entre quedas (13), acidentes motociclísticos (3), acidentes de bicicleta (2), acidentes com skate (2) e atropelamento (1).

Também identificamos a presença ou não de fraturas associadas ao trauma, e dividimos estas em simples e cominutiva. No grupo que evoluiu com rigidez foram diagnosticadas seis fraturas cominutivas e nove fraturas com traço simples. Cinco pacientes sofreram luxação simples do cotovelo sem fratura associada. Já no grupo sem rigidez, obtivemos oito fraturas com traço simples, três fraturas cominutivas e uma luxação simples do cotovelo.



Quanto à imobilização, o período médio que os pacientes permaneceram imobilizados foi de  $15,7 \pm 10,7$  dias nos casos e  $7 \pm 6,9$  dias no grupo sem rigidez do cotovelo ( $p = 0,017$ ).

Apenas cinco pacientes do grupo com rigidez pós-traumática do cotovelo tinham doenças associadas como diabetes mellitus, hipotireoidismo e hipertensão arterial. No grupo dos controles, quatro pacientes tinham comorbidades como hipertensão arterial, diabetes mellitus, câncer de tireoide tratado e fibromialgia ( $p = 0,695$ ). As características gerais da amostra podem ser observadas na **Tabela 3**.

A distribuição dos genótipos dos participantes do estudo estava em equilíbrio de Hardy–Weinberg<sup>84</sup>.

**Tabela 3 – Características gerais dos pacientes**

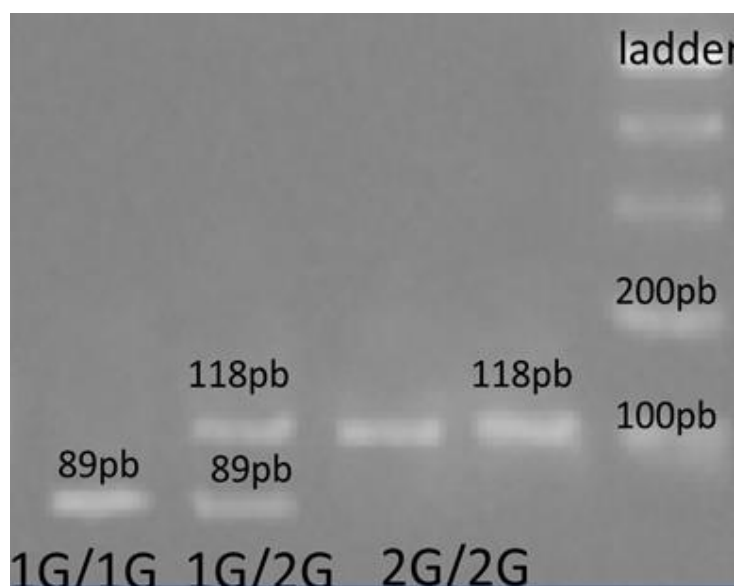
	<b>Casos</b> <b>(n = 20)</b>	<b>Controle</b> <b>(n = 12)</b>	<b>p - valor</b>
Sexo, n (%)			
Masculino	14 (70)	6 (50)	0,258
Feminino	6 (30)	6 (50)	
Idade, anos (média ± DP)	39,3 ± 11	47,4 ± 12,6	0,068
Raça, n (%)			
Branca	10 (50)	6 (50)	
Parda	9 (45)	3 (25)	0,566
Negra	1 (5)	1 (8,3)	
Amarela	0	2 (16,7)	
Lado dominante acometido, n (%)			
Sim	10 (50)	7 (58,3)	0,647
Não	10 (50)	5 (41,7)	
Lado acometido, n (%)			
Esquerdo	10 (50)	5 (41,7)	0,798
Direito	9 (45)	7 (58,3)	
Bilateral	1 (5)	0	
Tempo de imobilização, dias (média ± DP)	15,7 ± 10,7	6,9 ± 7	0,017
Tipo de trauma, n (%)			
Baixa energia	8 (40)	8 (66,7)	0,273
Alta energia	12 (60)	4 (33,3)	
Fraturas simples	9 (45)	8 (66,7)	0,398
Fraturas cominutivas	6 (30)	3 (25)	
Luxações	5 (25)	1 (8,3)	

(continuação)			
Tipo de tratamento, n (%)			
Não cirúrgico	11 (55)	8 (66,7)	0,713
Cirúrgico	9 (45)	4 (33,3)	
Reabilitação, semanas (média ± DP)	38,8 ± 32,6	16 ± 21	0,04
Comorbidades, n (%)			
Sim	5 (25)	4 (33,3)	0,695
Não	15 (75)	8 (66,7)	

DP: desvio padrão; n: número de pacientes; p: nível de significância

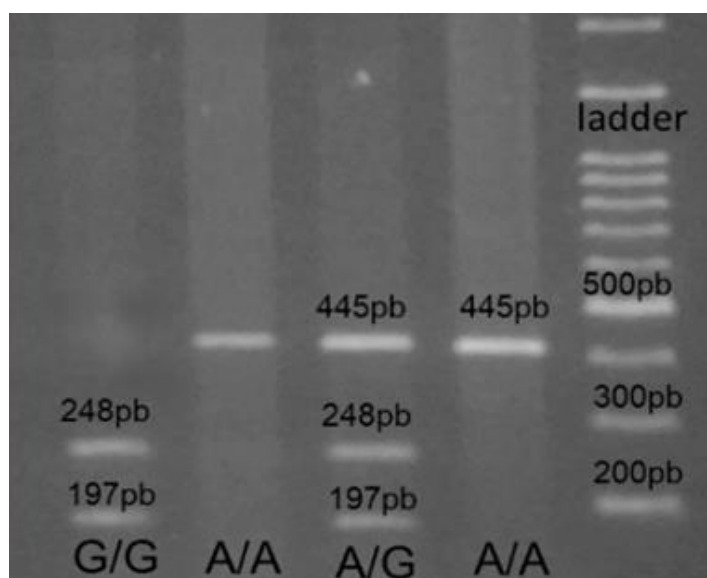
### 5.1 Eletroforese

Na eletroforese, o alelo 2G da MMP-1 foi representado por uma banda de DNA de 118 pares de bases, o alelo 1G por uma banda de DNA de 89 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (118 e 89 pares de bases) (**Figura 1**). Durante a eletroforese, a banda com 29 pares de bases do alelo 1G saía do gel.



**Figura 1** – Imagem do gel de eletroforese com os padrões de banda dos genótipos, após digestão enzimática, corados com GelRed® para MMP-1 na posição -1607 1G>2G (rs1799750)

Por sua vez, o alelo A da MMP-13 foi representado por uma banda de DNA de 445 pares de bases, e o alelo G foi representado pelas bandas de DNA de 248 e 197 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (bandas de 445, 248 e 197 pares de bases) (**Figura 2**).



**Figura 2** – Imagem do gel de eletroforese com os padrões de banda dos genótipos, após digestão enzimática, corados com GelRed® para MMP-13 na posição -77 A>G (rs2252070)

## 5.2 MMP-1

Para o polimorfismo genético da MMP-1 na posição -1607 G>2G (rs1799750), observamos que o alelo 1G foi mais frequente nos dois grupos com taxa de 79,2% e 65%, respectivamente ( $p = 0,497$ ) (**Tabela 4**).

Em relação aos genótipos, observamos que os genótipos 1G/2G e 2G/2G, estiveram presentes em 65% dos pacientes no grupo com rigidez ( $p = 0,599$ ). Contudo, não encontramos diferença significativa na frequência dos genótipos e alelos entre os grupos de casos e controles.

### 5.3 MMP-13

Observamos que no polimorfismo genético da MMP-13 na posição -77 A>G (rs2252070), que os alelos A e G também não demonstraram diferença significativa na frequência ( $p = 0,289$ ). O alelo A esteve mais frequente em ambos os grupos na taxa de 75% nos casos e 62,5% nos controles (**Tabela 4**).

Também não houve diferença significativa na frequência dos genótipos ( $p = 0,491$ ). No grupo controle, o genótipo A/A foi achado com uma frequência de 33,3%, o A/G de 58,3% e o G/G de 8,3%. E no grupo de casos esta taxa foi de 55%, 40% e 5%, respectivamente.

**Tabela 4** – Frequência do polimorfismo genético nas MMP-1 (rs1799750) e MMP-13 (rs2252070) nos grupos de casos e controles

<b>Gene</b>	<b>SNPs</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>p - valor</b>
<b>MMP-1</b>	Alelo, n(%)	n = 40	n = 24	
	1G	26 (65)	19 (79,2)	0,497
	2G	14 (35)	7 (20,8)	
	Genótipo, n(%)	n = 20	n = 12	
	1G/1G	7 (35)	6 (50)	0,599
	1G/2G	12 (60)	5 (41,7)	
	2G/2G	1 (5)	1 (8,3)	
<b>MMP-13</b>	Alelo, n(%)	n = 40	n = 24	
	A	30 (75)	15 (62,5)	0,289
	G	10 (25)	9 (37,5)	
	Genótipo, n(%)	n = 20	n = 12	
	A/A	11 (55)	4 (33,3)	0,491
	A/G	8 (40)	7 (58,3)	
	G/G	1 (5)	1 (8,3)	

P: Desvio Padrão; n: número de pacientes.

---

## **6. DISCUSSÃO**

---

## 6 DISCUSSÃO

O interesse na relação entre a influência genética e a rigidez articular tem aumentado recentemente. **Rodrigues et al.**<sup>77</sup> mostraram que o polimorfismo das regiões promotoras dos genes das metaloproteinases MMP-1 (-1607) (rs1799750) e MMP-13 (-77) (rs2252070) estão relacionados à doença de Dupuytren. O aumento da atividade de transcrição genética causada por esses polimorfismos parece elevar a expressão tecidual das MMPs nos pacientes e, com isso, intensificar a degradação e produção do colágeno na matriz extracelular.

Em outra doença com fisiopatologia semelhante como a capsulite adesiva do ombro, **Cui et al.**<sup>85</sup> sugeriram que as MMPs podem ser as responsáveis pelas alterações fibróticas da doença, particularmente, no que diz respeito ao distúrbio do equilíbrio entre TGF- $\beta$ 1 e MMPs, que contribui para o aumento da expressão do colágeno tipo I e II, aumento da fibrose e conseqüentemente espessamento e contratura da cápsula articular do ombro. Ainda em relação à capsulite adesiva do ombro, **Cohen et al.**<sup>75</sup> comprovaram que o polimorfismo genético da MMP-13 é um fator de risco independente, e que indivíduos com maior expressão gênica dessa metaloproteinase teriam maior disposição a desenvolver a doença.

**Hildebrand et al.**<sup>26</sup>, em uma publicação sobre contraturas pós-traumáticas do cotovelo, verificaram que o número de miofibroblastos nas cápsulas contraturadas era 4 a 5 vezes maior em comparação com as cápsulas sem rigidez, e os níveis de RNA mensageiro para MMP-1 e 13 também estavam significativamente aumentados. Além disso, os autores encontraram aumento da



renovação do colágeno nas cápsulas articulares desses pacientes quando comparadas com os tecidos semelhantes obtidos de doadores pareados livres de contraturas do cotovelo.

Em nosso estudo, o polimorfismo genético das metaloproteinases 1 (rs1799750) e 13 (rs2252070) não esteve associado com a rigidez pós-traumática do cotovelo. Na avaliação dos polimorfismos estudados, não foi possível encontrar diferença estatisticamente significativa na frequência dos alelos e genótipos do grupo de casos e controles das duas metaloproteinases estudadas. Mostramos também que fatores como o gênero, raça, idade, lado dominante, lateralidade, energia do trauma, tipo de tratamento, duração da reabilitação e comorbidades não estiveram relacionados ao aumento da incidência de rigidez do cotovelo pós-traumática.

Como não encontramos associação direta entre o polimorfismo genético das MMP-1 e 13 com a rigidez pós-traumática do cotovelo, acreditamos que o aumento das metaloproteinases nesses pacientes esteja relacionado a outras causas biológicas decorrentes do trauma e não à influência genética.

A expressão da maioria das MMPs é controlada ao nível da transcrição do DNA, na qual o polimorfismo genético exerceria influência direta. No entanto, foi demonstrado o papel de vários fatores externos que afetam tanto a ativação transcricional quanto a pós-transcricional das MMPs. Esses fatores incluem citocinas inflamatórias, hormônios e fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , EGFR, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )<sup>86-88</sup>.

Em resposta ao trauma no cotovelo, são secretados neuropeptídeos, pelo estímulo nociceptivo no gânglio dorsal, que estimulam a ativação dos mastócitos e a proliferação dos fibroblastos, ao mesmo tempo que reduz a apoptose dos

miofibroblastos. Os miofibroblastos são fibroblastos modificados com propriedades contráteis que se caracterizam pela expressão de uma proteína  $\alpha$ -SMA, que em condições normais de reparação tecidual são responsáveis pela contração da MEC e produção de colágeno. Dessa forma, a persistência na ativação do "eixo neuropeptídeos-mastócitos-miofibroblastos" promove hiperplasia celular na cápsula articular do cotovelo que resulta em encurtamento da MEC e deposição excessiva de colágeno.

Com base nos estudos de **Hildebrand et al.**<sup>8,26</sup>, nas cápsulas contraturadas, foi encontrado um aumento da quantidade de mastócitos ativados, que através de mediadores indutores intracelulares, tais como os fatores de crescimento (TGF- $\beta$ 1), ativam os miofibroblastos e alteram o equilíbrio do sistema de metaloproteinases da matriz e a síntese de colágeno, levando ao aumento da celularidade e fibrose do colágeno.

O equilíbrio da MEC é garantido por ritmos iguais de deposição e retirada do colágeno, esta última atividade é mediada pelas MMPs. Um desbalanço pode levar, quando predomina a retirada, aos quadros de tendinopatias e roturas, como a do tendão tibial posterior<sup>57</sup> e a do manguito rotador do ombro<sup>58</sup>. Quando predomina a deposição, podemos observar os processos fibróticos como a doença de Dupuytren<sup>66,68,89</sup>, a capsulite adesiva do ombro<sup>71,72</sup> e a rigidez do cotovelo<sup>6,21</sup>.

Por outro lado, em nosso trabalho, a imobilização prolongada esteve relacionada à rigidez pós-traumática. Relatamos um período médio de imobilização de 15 dias, prévio ao tratamento definitivo, que se comparado ao grupo controle demonstrou ser um período duas vezes maior ( $p = 0,017$ ).

Sabe-se que imobilização articular prolongada resulta em numerosos distúrbios físicos e bioquímicos dentro e ao redor das estruturas articulares, incluindo erosões da cartilagem articular, diminuição do conteúdo articular de proteoglicanos, alterações das fibras de colágeno e aderências sinoviais<sup>89,90</sup>. O tempo ideal de imobilização para cicatrização e o momento correto para iniciar o ganho de arco de movimento são pontos críticos no tratamento das lesões do cotovelo.

**Schollmeier et al.**<sup>91</sup> descreveram alterações estruturais que ocorrem na cápsula articular com a imobilização prolongada em modelos caninos. A diminuição da capacidade volumétrica da articulação e o comprometimento do movimento em conjunto com a formação de aderência mostraram que a imobilização favoreceu a contratura da cápsula e reduziu a capacidade volumétrica da articulação.

Da mesma forma, **Trudel et al.**<sup>92</sup> avaliaram, em modelo animal, a capacidade de recuperação do arco de movimento após períodos de imobilização articular e demonstraram que intervalos inferiores a duas semanas causaram contraturas principalmente devido à limitação muscular, podendo ser reversíveis com remobilização espontânea. Porém, quando imobilizadas por quatro ou mais semanas, as estruturas articulares contribuíram para a limitação do arco de movimento e as contraturas resultantes foram irreversíveis.

Este trabalho possui algumas limitações. O número de participantes do estudo é pequeno para um estudo genético, tomamos como base para o cálculo da amostra a publicação de **Godoy-Santos et al.**<sup>57</sup> que estudaram a associação do polimorfismo genético da MMP-1 com a tendinopatia do tendão tibial posterior. Entretanto, a rigidez do cotovelo é uma afecção pouco comum em um

grupo específico de pacientes. Notamos que os pacientes que evoluíram sem rigidez deixaram de fazer acompanhamento ambulatorial e, em contrapartida, os pacientes com rigidez que faziam consultas de rotina eram poucos.

O poder do estudo foi de 21,2% para avaliação do polimorfismo da MMP-1 e de 18,8% para a MMP-13. Com esses valores baixos, não podemos refutar completamente a hipótese que os polimorfismos abordados possam influenciar no desenvolvimento da rigidez do cotovelo. Além disso, selecionamos um grupo de pacientes muito heterogêneo no que diz respeito à idade, tipo de fratura e tipos de tratamento. A desvantagem nisso é a ausência de pareamento entre os pacientes dos grupos, o que aumenta a possibilidade de viés de confusão.

Por outro lado, este trabalho é o primeiro estudo da literatura nacional abordando a associação do polimorfismo genético das metaloproteinases da matriz com a rigidez pós-traumática do cotovelo, e entendemos que seja necessário uma investigação em maior escala, buscando decifrar se realmente há influência genética na patologia e com isso desenvolver formas alternativas de tratamento nos pacientes mais susceptíveis.

Acreditamos que a compreensão do processo fisiopatológico e dos fatores envolvidos no desenvolvimento da contratura do cotovelo pós-traumática é fundamental para avaliar os efeitos dos tratamentos atuais, descobrir novos métodos de tratamento como medicamentos inibidores das metaloproteinases e da deposição excessiva de colágeno e relacioná-los com o risco genético.

---

## **7. CONCLUSÃO**

## **7 CONCLUSÃO**

Os polimorfismos genéticos da MMP-1 na posição -1607 G>2G (rs1799750) e da MMP-13 na posição -77 A>G (rs2252070) não estiveram associados à rigidez articular pós-traumática do cotovelo.

Dentre os fatores de risco para a ocorrência da doença, a imobilização prolongada demonstrou exercer maior influência na rigidez articular após o trauma.

---

## **8. ANEXOS**

## 8 ANEXOS

## Anexo A – Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Associação entre o polimorfismo genético das metaloproteínas 1 e 13 e a rigidez articular pós-traumática do cotovelo

**Pesquisador:** ARNALDO AMADO FERREIRA NETO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 62291416.0.0000.0068

**Instituição Proponente:** HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.867.709

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um ensaio clínico com 48 pacientes com afecções traumáticas no cotovelo do Grupo de Ombro e Cotovelo do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo que serão divididos em;

Grupo teste – pacientes com histórico de trauma no cotovelo que evoluíram com rigidez articular sem melhora após 6 meses de tratamento fisioterápico;

Grupo controle – pacientes com histórico de trauma no cotovelo e após 6 meses do evento traumático evoluíram com arco de movimento funcional.

Serão obtidas algumas informações como; Idade; Sexo ;Raça; Profissão; Lado dominante; Lado acometido; Comorbidades Clínicas; Mecanismo de trauma e tipo de trauma; Tempo de imobilização do cotovelo, se realizada; Tipo de tratamento realizado, cirúrgico ou não cirúrgico; Intervalo entre o trauma e o tratamento cirúrgico, se houver; Realização de tratamento fisioterápico: tempo e frequência das sessões; Se houver fratura: Localização: intra ou extrarticular; Tipo de fratura (Classificação AO /OTA); Desvio mensurado em mm. Os paciente farão coleta de amostra de DNA a partir de células epiteliais da mucosa bucal, através de um bochecho com 3 ml de solução autoclavada de glicose a 3% (concentração isomolar com a saliva) durante 2 minutos.

Serão inclusos no estudo: Pacientes com história prévia de trauma que evoluiu com rigidez articular

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br





Continuação do Parecer: 1.867.709

no cotovelo; Pacientes com fratura prévia do cotovelo consolidada, incluindo o terço distal do úmero, extremidade proximal da ulna, extremidade proximal do rádio, tratados tanto de modo cirúrgico, como não cirúrgico; Pacientes com arco de movimento de flexo – extensão < 100° ou déficit de extensão > 30° ou flexão < 130°; Mais de 6 meses do trauma inicial; Pacientes com maturidade esquelética; Ter realizado fisioterapia prévia por no mínimo 4 meses.

Serão excluídos do estudo: Presença de pseudoartrose da fratura prévia; Bloqueio articular, com arco de movimento igual a 0°; Presença de consolidação viciosa da superfície articular distal do úmero e proximal da ulna; Osteoartrose grave do cotovelo (Tipo II e III segunda a classificação de Rettig e Hastings), Lesão neurológica do membro; Infecção ativa; Infecção prévia no cotovelo; Incongruência úmero-ulnar; Ossificação heterotópica; Doenças sistêmicas auto-imunes (Ex.: lúpus, artrite reumatóide, psoríase articular, etc); Presença de material de síntese intra-articular; Doença mental ou incapacidade para compreender os termos do trabalho; Antecedente de traumatismo crânio-encefálico, Uso de imobilização no cotovelo por tempo maior que 1 mês.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a relação dos polimorfismos na região promotora dos genes das MMPs 1 e 13 e a rigidez articular pós-traumática do cotovelo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os autores informam que não há risco para a saúde dos pacientes ou pesquisadores relativos esta pesquisa científica. E que o estudo de determinados padrões genéticos que aumentam a atividade das MMPs, poderia ajudar no entendimento da gênese da rigidez do cotovelo, identificar indivíduos suscetíveis e colaboraria no planejamento pré-operatório e desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de tais lesões.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo é relevante e inovador pois permitira uma melhor compreensão sobre a gênese da rigidez de cotovelo.

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

Está claro e bem redigido. Informa adequadamente ao participante da pesquisa seus objetivos, procedimentos e riscos. e garante liberdade de participação.

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

Nenhuma.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 1.867.709

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_798613.pdf	23/11/2016 08:38:06		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Gustavo_cartaanuencia.pdf	23/11/2016 08:00:37	ARNALDO AMADO FERREIRA NETO	Aceito
Outros	Gustavo_CadastroDaPesquisa1230.pdf	27/10/2016 16:38:36	ARNALDO AMADO FERREIRA NETO	Aceito
Folha de Rosto	Gustavo_folhaderosto.pdf	27/10/2016 16:37:10	ARNALDO AMADO FERREIRA NETO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Gustavo_mestrado_tcle.docx	22/09/2016 20:05:10	ARNALDO AMADO FERREIRA NETO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Gustavo_mestrado_projeto.docx	22/09/2016 20:03:39	ARNALDO AMADO FERREIRA NETO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 15 de Dezembro de 2016

Assinado por:  
ALFREDO JOSE MANSUR  
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## Anexo B – Carta de Anuência USP – UFPR



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular



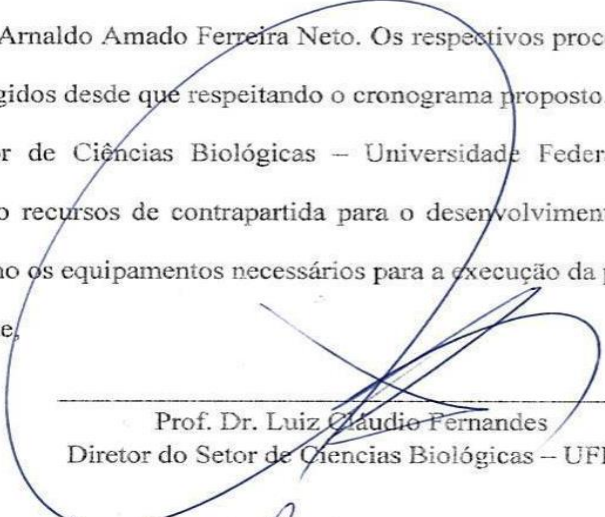
Curitiba, 03 de outubro de 2016.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ortopedia e Traumatologia  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

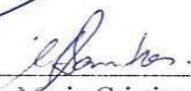
Declaro para os devidos fins que o Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná esta de acordo com as etapas previstas para serem realizadas junto ao Depto. Biologia Celular com coordenação da Profa. Dra Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, relativas ao Projeto de Pesquisa intitulado "Associação entre o polimorfismo genético das metaloproteinases 1 e 13 e a rigidez articular pós-traumática do cotovelo" proposto como projeto do aluno de mestrado Gustavo de Mello Ribeiro Pinto, orientado pelo Prof. Dr. Arnaldo Amado Ferreira Neto. Os respectivos procedimentos são factíveis nos prazos exigidos desde que respeitando o cronograma proposto.

O Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná também oferecerá como recursos de contrapartida para o desenvolvimento do projeto o espaço físico bem como os equipamentos necessários para a execução da proposta.

Atenciosamente,

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes  
Diretor do Setor de Ciências Biológicas – UFPR

De acordo:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Cristina Leme G dos Santos  
Depro Biologia Celular - UFPR

---

**Anexo C – Questionário de dados dos pacientes**

## COLETA DE DADOS

Etiqueta do paciente

- Idade
- Sexo
- Raca
- Profissão
- Lado dominante
- Lado acometido
- Comorbidades clínicas
- Mecanismo de trauma e tipo de trauma
- Tempo de imobilização do cotovelo
- Tipo de tratamento realizado, cirúrgico ou não cirúrgico
- Intervalo entre o trauma e o tratamento cirúrgico
- Realização de tratamento fisioterápico: tempo e frequência das sessões
- Se houver fratura: tipo de fratura (simples x cominutiva)

---

---

## **9. REFERÊNCIAS**

---

**9 REFERÊNCIAS**

1. Hughes J. The stiff elbow. *Orthopaedic Proceedings*. 2012;94-B(Supp XXIII):112-112.
2. Morrey BF, Askew LJ, Chao EY. A biomechanical study of normal functional elbow motion. *J Bone Joint Surg Am*. 1981;63(6):872-7.
3. Charalambos CP, Morrey BF. Posttraumatic elbow stiffness. *J Bone Joint Surg Am*. 2012;94(15):1428-37.
4. Mellena JJ, Lindenhovius ALC, Jupiter JB. The posttraumatic stiff elbow: an update. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2016;9(2):190-8.
5. Motta Filho G, Galvão MV. Rigidez pós-traumática do cotovelo. *Rev Bras Ortop*. 2010;45(4):347-54.
6. Hildebrand KA. Posttraumatic elbow joint contractures: defining pathologic capsular mechanisms and potential future treatment paradigms. *J Hand Surg*. 2013;38(11):2227-33.
7. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *ABCD, Arq Bras Cir Dig*. 2007;20(1):51-8.
8. Hildebrand KA, Gallant-Behm CL, Kydd AS, Hart AD. The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. *Sports Med Arthrosc Rev*. 2005;13(3):136-44.
9. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-46.

10. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponier C, Brown RA. Myfibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349-63.
11. Desmoulière A, Gabbiani G. The role of myofibroblasts in wound healing and fibrocontractive diseases. In: Clark RAF, editor. *The molecular and cellular biology of wound repair.* New York: Plenum Press; 1996. p. 391-423.
12. Araújo RVS, Silva FO, Melo-Júnior MR, Porto ALF. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. *Rev Cienc Med Biol.* 2010;10(1):82-8.
13. Garofalo R, Cesari E, Vinci E, Castagna A. Role of metalloproteinases in rotator cuff tear. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2011;19(3):207-12.
14. Thompson MW, McInnes RR, Willard HF, Thompson JS. *Thompson & Thompson genetics in medicine.* Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1991.
15. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999;234(2):177-86.
16. Munhoz FB, Godoy-Santos AL, Santos MC. MMP-3 polymorphism: genetic marker in pathological processes (Review). *Mol Med Rep.* 2010;3(5):735-40.
17. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res.* 1998;58(23):5321-5.
18. Cooney WP. Elbow arthroplasty: historical perspective and current concepts. In: Morrey BF (editor). *The elbow and its disorders.* Philadelphia: W B Saunders Co; 1993. Cap. 47, p. 583-601.

- 
19. Cohen MS, Schimmel DR, Masuda K, Hastings H 2nd, Muehleman C. Structural and biochemical evaluation of the elbow capsule after trauma. *J Shoulder Elbow Surg.* 2007;16(4):484-90.
  20. Keschner MT, Paksima N. The stiff elbow. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007;65(1):24-8.
  21. Myden C, Hildebrand K. Elbow joint contracture after traumatic injury. *J Shoulder and Elbow Surg.* 2011;20(1):39-44.
  22. Akeson WH. An experimental study of joint stiffness. *J Bone Joint Surg Am.* 1961;43:1022-34.
  23. Gallay SH, Richards RR, O'Driscoll SW. Intraarticular capacity and compliance of stiff and normal elbows. *Arthroscopy.* 1993;9(1):9-13.
  24. Lindenhovius AL, Jupiter JB. The posttraumatic stiff elbow: a review of the literature. *J Hand Surg.* 2007;32(10):1605-23.
  25. Nandi S, Maschke S, Evans PJ, Lawton JN. The stiff elbow. *Hand (N Y).* 2009;4(4):368-79.
  26. Hildebrand, KA, Zhang M, Van Snellenberg W, King GJW, Hart DA. Myofibroblast numbers are elevated in human elbow capsules after trauma. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(419):189-97.
  27. Hildebrand KA, Zhang M, Hart DA. High rate of joint capsule matrix turnover in chronic human elbow contractures. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;439:228-34.
  28. Germscheid NM, Hildebrand KA. Regional variation is present in elbow capsules after injury. *Clin Orthop Relat Res.* 2006;450:219-24.
  29. Hildebrand KA, Mei Z, Germscheid NM, Wang C, Hart DA. Cellular, matrix, and growth factor components of the joint capsule are modified early in the



- process of posttraumatic contracture formation in a rabbit model. *Acta Orthopaedica*. 2008;79(1):116-25.
30. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Nat Acad Science USA*. 1962;48(6):1014-22.
  31. Bauer EA, Eisen AZ, Jeffrey JJ. Immunologic relationship of purified human skin collagenase to other human and animal collagenases. *Biochim Biophys Acta*. 1970;206(1):152-60.
  32. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem*. 1986;261(14):6600-5.
  33. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10(5):602-8.
  34. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21491-21494.
  35. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-39.
  36. Jeffrey JJ, Gross J. Collagenase from rat uterus isolation and partial characterization. *Biochemistry*. 1970;9(2):268-73.
  37. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(3):207-14.
  38. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling

- pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2002;4(3):157-64.
39. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(9):6292-7.
40. Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(2):283-8.
41. Zeng GQ, Chen AB, Li W, Song JH, Gao CY. High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. *Gen Mol Res.* 2005;14(4):14811-22.
42. Freije JM, Díez-Itza I, Balbín M, Sánchez LM, Blasco R, Tolivia J, López-Otín C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem.* 1994;269(24):16766-73.
43. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. *A Role in Osteoarthritis.* *J Clin Investigat.* 1996;97(9):2011-19.
44. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997;74(2):111-22.
45. Knäuper V, Cowell S, Smith B, López-Otín C, O'Shea M, Morris H, Zardi L, Murphy G. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and

- 
- tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem.* 1997;272(12):7608-16.
46. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Moldovan F et al. Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumat.* 1998;25(8):1585-94.
47. Tardif G, Reboul P, Pelletier JP, Pelletier JM. Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (Collagenase-3). *Mod Rheumatol.* 2004;14(3):197-204.
48. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res.* 1998;8(12):1229-31.
49. Sherry ST, Ward M, Sirotkin K. dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Res.* 1999;9(8):67-9.
50. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000;19(7):623-9.
51. Stoneking M. Single nucleotide polymorphisms. From the evolutionary past. *Nature.* 2001;409(6822):821-2.
52. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol.* 2007;211(1):19-26.
53. Jurajda M, Muzík J, Izakovicová Hollá L, Vácha J. A newly identified single nucleotide polymorphism in the promoter of the matrix metalloproteinase-1 gene. *Mol Cell Probes.* 2002;16(1):63-6.
-

- 
54. Massarotti M, Marchesoni A, Biondi ML, Marasini B. Polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter gene and severity of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002;29(10):2241; author reply 2242.
  55. Godoy-Santos AL, D'Elia CO, Teixeira WJ, Cabrita HB, Camanho GL. Aseptic loosening of total hip arthroplasty: preliminary genetic investigation. *J Arthroplasty.* 2009;24(2):297-302.
  56. Planello AC, Campos MI, Meloto CB, Secolin R, Rizatti-Barbosa CM, Line SR, de Souza AP. Association of matrix metalloproteinase gene polymorphism with temporomandibular joint degeneration. *Eur J Oral Sci* 2011;119:1-6.
  57. Godoy-Santos A, Cunha MV, Ortiz RT, Fernandes TD, Mattar R Jr, dos Santos MC. MMP-1 promoter polymorphism is associated with primary tendinopathy of the posterior tibial tendon. *J Orthop Res.* 2013;31(7):1103-7.
  58. Assunção JH, Godoy-Santos AL, Dos Santos MCLG, Malavolta EA, Gracitelli MEC, Ferreira Neto AA. Matrix Metalloproteases 1 and 3 Promoter Gene Polymorphism Is Associated With Rotator Cuff Tear. *Clin Ort Rel Res.* 2017;475(7):1904-10.
  59. Yoon S, Kuivaniemi H, Gatalica Z, Olson JM, Buttice G, Ye S, Norris BA, Malcom GT, Strong JP, Tromp G. MMP13 promoter polymorphism is associated with atherosclerosis in the abdominal aorta of young black males. *Matrix Biol.* 2002;21(6):487-98.
  60. Tannure PN, Kuchler EC, Falagan-Lotsch P, Amorim LM, Raggio Luiz R, Costa MC, Vieira AR, Granjeiro JM. MMP13 polymorphism decreases risk for dental caries. *Caries Res.* 2012;46(4):401-7.

61. Vašků A, Meluzín J, Blahák J, Kincl V, Goldbergová MP, Sitar J, Zlámal F, Bienertová-Vašků J, Vítovec J. Matrix metalloproteinase 13 genotype in rs640198 polymorphism is associated with severe coronary artery disease. *Dis Markers*. 2012;33(1):43-9.
62. Gao P, Yang JL, Zhao H, You JH, Hu Y. Common polymorphism in the MMP-13 gene may contribute to the risk of human cancers: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014;35(10):10137-48. Retraction in: Gao P, Yang JL, Zhao H, You JH, Hu Y. *Tumour Biol*. 2015;36(9):7321.
63. Munhoz FBA. *Associação entre o polimorfismo na MMP-13 (isolado e em haplótipo com MMP-1 e MMP-8) e tendinopatia primária do tibial posterior* [dissertação]. Curitiba: Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná; 2011.
64. Colomer J, Iturriaga C, Bonne G, Schwartz K, Manilal S, Morris GE, Puche M, Fernández-Alvarez E. Autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy: a new family with late diagnosis. *Neuromuscul Disord*. 2002;12(1):19-25.
65. Nesterenko S, Sanchez-Sotelo J, Morrey BF. Refractory elbow arthrofibrosis. A report of four cases. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91(11):2693-5.
66. Hu FZ, Nystrom A, Ahmed A, Palmquist M, Dopico R, Mossberg I, Gladitz J, Rayner M, Post JC, Ehrlich GD, Preston RA. Mapping of an autosomal dominant gene for Dupuytren's contracture to chromosome 16q in a Swedish family. *Clin Genet*. 2005;68(5):424-9.

67. Laneuville O, Zhou J, Uthoff HK, Trudel G. Genetic influences on joint contractures secondary to immobilization. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;456:36-41.
68. Ojwang JO, Adrianto I, Gray-McGuire C, Nath SK, Sun C, Kaufman KM, Harley JB, Rayan GM. Genome-wide association scan of Dupuytren's Disease. *J Hand Surg.* 2010;35(12):2039–45.
69. Michou L, Lermusiaux JL, Teyssedou JP, Bardin T, Beaudreuil J, Petit-Teixeira E. Genetics of Dupuytren's disease. *Joint Bone Spine.* 2012;79(1):7-12.
70. Capstick R, Bragg T, Giele H, Furniss D. Sibling Recurrence Risk in Dupuytren's Disease. *J Hand Surg Eur Vol.* 2013;38(4):424-9.
71. Xu Q, Gai PY, Lv HL, Li GR, Liu XY. Association of MMP3 genotype with susceptibility to frozen shoulder: a case-control study in a Chinese Han population. *Genet Mol Res.* 2016;15(1).
72. Prodromidis AD, Charalambous CP. Is there a genetic predisposition to frozen shoulder?: A systematic review and meta-analysis. *JBJS Rev.* 2016;4(2):01874474-201602000-00004.
73. Chen W, Meng J, Qian H, Deng Z, Chen S, Xu H, Sun W, Wang Y, Zhao J, Bao N. A study of IL-1 $\beta$ , MMP-3, TGF- $\beta$ 1, and GDF5 polymorphisms and their association with primary frozen shoulder in a Chinese Han population. *Biomed Res Int.* 2017;2017:3681645.
74. Malavolta EA, Gracitelli MEC, Pinto GMR, Silveira AZF, Assunção JH, Ferreira Neto AA. Etnia asiática: um fator de risco para a capsulite adesiva? *Rev Bras Ortop.* 2018;53(5):602-6.

- 
75. Cohen C, Leal MF, Loyola LC, Santos SEB, Ribeiro-Dos-Santos ÂKC, Belangero PS, Figueiredo EA, Wajnsztein A, de Oliveira AM, Smith MC, Andreoli CV, de Castro Pochini A, Cohen M, Ejnisman B, Faloppa F. Genetic variants involved in extracellular matrix homeostasis play a role in the susceptibility to frozen shoulder: a case-control study. *J Orthop Res.* 2019;37(4):948-56.
  76. Mann CJ, Bradley AM, Jones ER, McNamara IR, Smith TO, Riley GP. Stiffness post-total knee replacement: a proof of principle study investigating the effect of gene expression analysis of markers of fibrosis. *Knee.* 2019;26(4):914-22.
  77. Rodrigues MP. *Influência de polimorfismos genéticos em metaloproteinases na moléstia de Dupuytren* [dissertação]. Faculdade Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo; 2019.
  78. Rettig LA, Hastings H 2nd, Feinberg JR. Primary osteoarthritis of the elbow: lack of radiographic evidence for morphologic predisposition, results of operative debridement at intermediate follow-up, and basis for a new radiographic classification system. *J Shoulder Elbow Surg.* 2008;17(1):97-105.
  79. Salminen S, Pihlajamäki H, Avikainen V, Kyrö A, Böstman O. Specific features associated with femoral shaft fractures caused by low-energy trauma. *J Trauma.* 1997;43(1):117-22.
  80. Jovanović M, Janjić Z, Marić D. [Principles of management of high-energy injuries of the leg]. *Med Pregl.* 2002;55(9-10):437-42.
  81. Rüedi TP, Buckley RE, Moran CG. *Princípios AO de Tratamento de Fraturas.* Porto Alegre: Artmed; 2009.

82. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J.* 2007;18(2):148-52.
83. Schneider S, Roessli D and Excoffier L. *Arlequin*: a software for population genetics data analysis. User manual ver 2.000 [internet]. Geneva: Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva; 2009. Available from: [http://dna.ac/filogeografia/labs/Lab\\_SIMCOAL\\_Topicos\\_Crawford\\_2009.pdf](http://dna.ac/filogeografia/labs/Lab_SIMCOAL_Topicos_Crawford_2009.pdf).
84. Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science.* 1908;28(706):49-50.
85. Cui J, Lu W, He Y, Jiang L, Li K, Zhu W, Wang D. Molecular biology of frozen shoulder-induced limitation of shoulder joint movements. *J Res Med Sci.* 2017;22:61.
86. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1285-342.
87. Liutkeviciene R, Liutkevicius V, Giedraitiene A, Kriauciuniene L, Asmoniene V. Influence of matrix metalloproteinases MMP-2, -3 and on age-related macular degeneration development. In: Travascio F (editor). *The role of matrix metalloproteinase in human body pathologies*. Croatia: InTech; 2017. Chap. 4, p. 73-90.
88. Gaffney J, Solomonov I, Zehorai E, Sagi I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol.* 2015;44-46:191-9.



89. Monument MJ, Hart DA, Salo PT, Befus AD, Hildebrand KA. Posttraumatic elbow contractures: targeting neuroinflammatory fibrogenic mechanisms. *J Orthop Sci.* 2013;18(6):869-77.
90. Lake SP, Castile RM, Borinsky S, Dunham CL, Havlioglu N, Galatz LM. Development and use of an animal model to study post-traumatic stiffness and contracture of the elbow. *J Orthop Res.* 2016;34(2):354-64.
91. Schollmeier G, Uthoff HK, Sarkar K, Fukuhara K. Effects of immobilization on the capsule of the canine glenohumeral joint. A structural functional study. *Clin Orthop Relat Res.* 1994;(304):37-42
92. Trudel G, Uthoff HK, Goudreau L, Laneuville O. Quantitative analysis of the reversibility of knee flexion contractures with time: an experimental study using the rat model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15:338.

# **APÊNDICES**

Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-  
HCFMUSP**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL  
LEGAL

1.NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: .....

SEXO: M  F

DATA DE NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: .....

BAIRRO:..... CIDADE..... CEP:.....

TELEFONE: (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

GRAU DE PARENTESCO .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: .....

SEXO: M  F

DATA DE NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: .....

BAIRRO:..... CIDADE..... CEP:.....

TELEFONE: (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Associação entre o polimorfismo genético das metaloproteinases 1 e 13 e a rigidez articular pós-traumática do cotovelo.**

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO  RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

- A principal causa de rigidez articular do cotovelo é o trauma da articulação. Após o trauma, inicia o processo de cicatrização dos tecidos lesionados. Durante esse processo, algumas células produzem substâncias consideradas responsáveis pela rigidez da articulação do cotovelo. Porém, nem todos os pacientes evoluem com rigidez do cotovelo. Por esse motivo, a possibilidade de causas genéticas para essas lesões precisa ser estudada e o objetivo desse estudo é investigar a frequência dos genes em pacientes com diagnóstico de rigidez articular do cotovelo após trauma para verificar a possível relação entre o polimorfismo genético e o desenvolvimento dessa doença.
- Esse estudo será feito com um único exame mediante coleta simples de saliva. Os pacientes selecionados farão bochecho com água e açúcar e, em seguida, cuspirão em um recipiente plástico pequeno. A leitura das informações genéticas presentes na saliva é exame de alta tecnologia não rotineiro no nosso meio. Não haverá outros exames ou procedimentos invasivos.
- Não haverá desconfortos ou riscos na coleta e execução desse exame.
- Em relação aos benefícios para os participantes, não há benefício direto para o participante; trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que fatores genéticos interfiram na cicatrização da cápsula articular

- Com esse estudo, poderemos concluir a presença de algum benefício aos pacientes.
- Está garantido o acesso, em qualquer etapa do estudo, aos achados da pesquisa, ao seu prontuário e aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.
- principal investigador responsável pelo estudo é o Dr. Gustavo de Mello Ribeiro Pinto que pode ser encontrado no endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, nº 333, 3º andar - Tel 2661 - 2486.
- Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) à Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5o andar, telefone 3069 6442, ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: 3069 6442, ramal 26. E-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br).
- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.
- É garantido aos participantes o direito de confidencialidade das informações obtidas no estudo, as quais serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles.
- É garantido o direito aos participantes de serem mantidos atualizados sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.
- Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, nem compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- Há compromisso absoluto do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Associação entre o polimorfismo genético das metaloproteinases 1 e 13 e a rigidez articular pós-traumática do cotovelo”.

Eu discuti com o Dr. Gustavo de Mello Ribeiro Pinto sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

-----

Assinatura da Testemunha Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.)

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

-----