

Carina Cohen Grynbaum

**POLIMORFISMOS DA MATRIZ EXTRACELULAR
NO OMBRO CONGELADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

SÃO PAULO

2018

Carina Cohen Grynbaum

**POLIMORFISMOS DA MATRIZ EXTRACELULAR
NO OMBRO CONGELADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Faloppa

Coorientadores: Prof. Benno Ejnisman

Dr^a. Mariana Ferreira Leal

SÃO PAULO

2018

Grynbaum, Carina Cohen.

Polimorfismos da matriz extracelular no ombro congelado. / Carina Cohen Grynbaum– São Paulo, 2018.

XXIII, 152f.

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

Título em inglês: Extracellular matrix polymorphisms in frozen shoulder.

1. Ombro congelado.
2. Capsulite Adesiva.
3. Genética.
4. Polimorfismos.
5. Matriz extracelular

Universidade Federal de São Paulo



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIRURGIA TRANSLACIONAL**

Coordenadora: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Flávio Faloppa

Coorientadores: Prof. Benno Ejnisman

Dr^a. Mariana Ferreira Leal

2018

Auxílio Financeiro:

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

- Auxílio à pesquisa (Jovem Pesquisador): Processo número 11/22548-2
Pesquisador Responsável: Mariana Ferreira Leal
Orientador: Prof. Dr. Moises Cohen

DEDICATÓRIAS

*Aos meus três amores,
Artur, Mário e ao pequeno que está à caminho,
pois o amor de vocês completa a minha existência.*

Ao meu amado pai Moisés, por ser tanto na profissão quanto na vida, o melhor exemplo e inspiração que eu poderia ter. Pelo exemplo de ser humano, de generosidade, determinação, bom senso, habilidade agregadora e por me atender sempre de prontidão mesmo na sua vida atribulada.

À minha amada mãe e melhor amiga, Estelita, por sempre incentivar os estudos e apoiar meus passos. Por ser uma grande facilitadora em minha vida, tornando o impossível em possível sempre que pode. Exemplo de força que transborda amor e nunca me faltou em qualquer momento da vida.

À minha querida irmã Camila, que segue com seu brilho, sempre firme ao meu lado nos caminhos da vida e da ortopedia. Que me presenteou com um querido irmão, Joni e com o Pepe e o Fipe, dois sobrinhos apaixonantes.

Ao meu marido e grande companheiro de vida, Artur, pelo amor, bondade e sorriso diários, fazendo da minha vida um sonho desde que entrou nela. Por ter me dado minha maior jóia, nosso doce filho Mario, por quem me derreto de amor.

À Vovó Rebeca, minha luz e inspiração de bondade, que deve me acompanhar lá de cima sempre com um doce sorriso e brilho no olhar.

AGRADECIMENTOS

Ao **PROF. DR. MOISÉS COHEN**, PROFESSOR TITULAR DO DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (DOT/EPM/UNIFESP), grande idealizador desse projeto, por oferecer todo suporte necessário. Trabalhador incansável, cuja paixão pela medicina e a curiosidade estimulam a veia pesquisadora em cada um dos seus alunos.

Ao meu Orientador, **PROF. DR. FLÁVIO FALOPPA**, PROFESSOR TITULAR DO DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (DOT/EPM/UNIFESP), profissional que admiro muito, pela orientação, suporte, por compartilhar seu conhecimento e pelo incentivo sempre positivo com que me estimulou ao longo dessa jornada.

Ao Professor **DR. BENNO EJNISMAN**, PROFESSOR ADJUNTO DA DISCIPLINA DE MEDICINA DO ESPORTE E DA ATIVIDADE FÍSICA DO DOT/EPM/UNIFESP, pela amizade e coorientação nesse trabalho e em muitos aspectos da minha vida. Pela receptividade com que sempre recebeu minhas dúvidas e questionamentos e, principalmente, pelo carinho com minha família e pelo privilégio de poder compartilhar seu dia a dia e me espelhar como pessoa e profissional.

À **DRA. MARIANA FERREIRA LEAL**, DOUTORA EM CIÊNCIAS PELA UNIFESP, minha coorientadora, cientista talentosa e perspicaz que sempre estimulou meu lado pesquisadora. Essencial na

obtenção dos auxílios de pesquisa, na formulação dos resultados e na elaboração dos artigos científicos.

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL** e à Coordenadora, **PROFA DRA LYDIA MSAKO FERREIRA**, PROFESSORA TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA EPM/UNIFESP, pela oportunidade de desenvolver esse estudo.

À agência de fomento, **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)**, pelo financiamento deste estudo.

Ao Professor **DR. ALBERTO DE CASTRO POCHINI**, PROFESSOR ADJUNTO DA DISCIPLINA DE MEDICINA DO ESPORTE E DA ATIVIDADE FÍSICA DO DOT/EPM/UNIFESP, amigo, exemplo de humildade e dedicação ao CETE/UNIFESP e à ciência.

Ao Professor **DR. CARLOS VICENTE ANDREOLI**, PROFESSOR ADJUNTO DA DISCIPLINA DE MEDICINA DO ESPORTE E DA ATIVIDADE FÍSICA DO DOT/EPM/UNIFESP, por sua colaboração na coleta dos casos, amizade e dedicação ao CETE/UNIFESP.

Ao amigo **DR. PAULO SANTORO BELANGERO**, PROFESSOR AFILIADO DA DISCIPLINA DE MEDICINA DO ESPORTE E DA ATIVIDADE FÍSICA DO DOT/EPM/UNIFESP, pela amizade, sorriso certo, companheirismo e colaboração nas coletas. Por dispor de seu tempo para leitura e revisão dessa tese, sempre com muita gentileza e prontidão.

Ao amigo **EDUARDO ANTÔNIO DE FIGUEIREDO**, PÓS-DOUTORANDO NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pela amizade, companheirismo e colaboração nas coletas.

À **PROFA. DRA. MARÍLIA CARDOSO DE ARRUDA SMITH**, PROFESSORA TITULAR DA DISCIPLINA DE GENÉTICA DA EPM/UNIFESP, por acreditar em nossa pesquisa e promover o suporte necessário para sua realização.

À **LEONOR CASILLA LOYOLA**, PÓS-DOUTORANDA NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, que mesmo sempre tímida e discreta, desempenhou seu papel com brilhantismo.

À **ROSELI PASCHOA**, pelo apoio e grande ajuda na confecção dessa tese.

A todos os colegas e funcionários das **DISCIPLINAS DE GENÉTICA E MEDICINA ESPORTIVA**.

Aos colegas e funcionários do **DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA**.

A todos os amigos que fiz durante esse caminho na **ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA E NO HOSPITAL SÃO PAULO**.

A todos os **PACIENTES** que aceitaram participar deste estudo.

A **CAPES**, pelo apoio ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP.

“Uma mente que tenha sido estirada por novas ideias nunca poderá recobrar sua forma original”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

DEDICATÓRIAS	VI
AGRADECIMENTOS	VII
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE QUADROS E FIGURAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVI
RESUMO	XX
<i>ABSTRACT</i>	XXII
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	5
3 LITERATURA	7
4 MÉTODO	36
5 RESULTADOS	48
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÃO	84
8 REFERÊNCIAS	86
NORMAS ADOTADAS	114
APÊNDICES	116
ANEXOS	126
GLOSSÁRIO	146
FONTES CONSULTADAS	151

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Variantes genéticas estudadas e ensaios clínicos utilizados para a genotipagem. 44
- Tabela 2** - Distribuição das variáveis clínicas nos grupos ombro congelado (OC) e controle de todos os indivíduos e de indivíduos com dados de ancestralidade genética. 50
- Tabela 3** - Distribuição das variáveis clínicas de todos indivíduos segundo sexo feminino ou masculino. 52
- Tabela 4A** - Frequência de genótipos nos grupos casos (OC) e controles. 54
- Tabela 4B** - Frequência de genótipos nos grupos casos (OC) e controles. 55
- Tabela 4C** - Frequência de genótipos nos grupos casos (OC) e controles. 56
- Tabela 5A** – Frequências de genótipos nos grupos casos (OC) e controles, ajustado por idade e sexo. 57
- Tabela 5B** – Frequências de genótipos nos grupos casos (OC) e controles, ajustado por idade, sexo e ancestralidade. 58
- Tabela 5C** – Frequências de genótipos nos grupos casos (OC) e controles, ajustado por idade, sexo, ancestralidade e comorbidades. 59

Tabela 6 - Fatores preditivos para susceptibilidade ao OC após regressão logística multivariada.	60
Tabela 7A – Frequência de genótipos nos indivíduos femininos dos grupos casos (OC) e controles, ajustados por idade e sexo.	61
Tabela 7B – Frequência de genótipos nos indivíduos femininos dos grupos casos (OC) e controles, ajustados por idade, sexo e ancestralidade.	62
Tabela 7C – Frequência de genótipos nos indivíduos femininos dos grupos casos (OC) e controles, ajustados por idade, sexo, ancestralidade e comorbidades.	63
Tabela 8A – Frequência de genótipos nos indivíduos masculinos dos grupos casos (OC) e controles, ajustados por idade e sexo.	64
Tabela 8B – Frequência de genótipos nos indivíduos masculinos dos grupos casos (OC) e controles, ajustados por idade, sexo e ancestralidade.	65
Tabela 8C – Frequência de genótipos nos indivíduos masculinos dos grupos casos (OC) e controles, ajustados por idade, sexo, ancestralidade e comorbidades.	66
Tabela 9 - Frequência de haplótipos nos grupos casos (OC) e controles.	70
Tabela 10 - Frequências de haplótipos nos grupos casos (OC) e controles.	72

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1. Vista anterolateral do intervalo rotador ombro direito, delimitado pelo trajeto em azul limitando bordas dos músculos supraespinhal (SS) e subescapular (Sub) e que se estende do processo coracoide (C) até a borda medial do tendão da cabeça longa do bíceps (BT) 12

Figura 2. Imagem artroscópica do ombro direito, demonstrando à esquerda a glenóide e à direita evidenciando região anterior da cápsula articular espessada e hiperemiada diante do quadro de ombro congelado. 12

Quadro I. Critérios de Inclusão 38

Quadro II. Critérios de exclusão 38

Quadro III. Critérios de não inclusão 38

Figura 3 (A-B-C-D). Frequência dos genótipos significativos nos grupos casos (OC) e controles. A) *MMP13* rs2252070; B) *MMP9* rs17576; C) *TGFBI* rs1800470; D) *TGFBR1* rs1590. 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>BT</i>	Tendão da Cabeça Longa do Bíceps
<i>C</i>	Processo Coracóide
<i>COL1A1</i>	Colágeno, Tipo I, Alfa 1
<i>COL1A2</i>	Colágeno, Tipo I, Alfa 2
<i>COL3A1</i>	Colágeno, Tipo III, Alfa 1
<i>COL5A1</i>	Colágeno, Tipo V, Alfa 1
<i>COL5A2</i>	Colágeno, Tipo V, Alfa 2
<i>COL5A3</i>	Colágeno, Tipo V, Alfa 3
<i>COMP</i>	Proteínas Oligoméricas da Matriz da Cartilagem
<i>DD</i>	Doença de <i>Dupuytren</i>
<i>DM</i>	Diabete Melito
<i>DNA</i>	Ácido Desoxirribonucleico
<i>DOT</i>	Departamento de Ortopedia e Traumatologia
<i>EDS</i>	Síndrome <i>Ehlers-Danlos</i>
<i>EDTA</i>	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
<i>EHW</i>	Equilíbrio de <i>Hardy Weinberg</i>
<i>EPM</i>	Escola Paulista de Medicina
<i>FN</i>	Fibronectina

<i>FNI</i>	Fibronectina 1
<i>INDELS</i>	Polimorfismos de Inserção ou Deleção
IR	Intervalo dos Rotadores
ISAKOS	International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine
LCA	Ligamento Cruzado Anterior
LCU	Ligamento Coracoumeral
LGUS	Ligamento Glenoumeral Superior
LGUI	Ligamento Glenoumeral Inferior
LH	Lisil Hidroxilase
<i>Loci</i>	Local fixo no cromossomo onde está determinado gene
Kb	Kilobase
kDa	kiloDalton
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinases
<i>MMP 2</i>	Metaloproteinase 2
<i>MMP 3</i>	Metaloproteinase 3
<i>MMP 9</i>	Metaloproteinase 9
<i>MMP 13</i>	Metaloproteinase 13
<i>MMP 14</i>	Metaloproteinase 14
mRNA	RNA mensageiro

N	Tamanho Amostral
OC	Ombro Congelado
OR	<i>odds ratio</i> (razão de chances)
OI	Osteogênese Imperfeita
<i>PLOD1</i>	Pró-colágeno-Lisina, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 1
<i>PLOD2</i>	Pró-colágeno-Lisina, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2
<i>PLOD3</i>	Pró-colágeno-Lisina, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 3
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa via Transcriptase Reversa
RM	Ressonância Magnética
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
SS	Músculo Supraespinal
Sub	Músculo Subescapular
<i>TGFBI</i>	Fator de crescimento transformador, Beta 1
<i>TGFBRI</i>	Receptor 1 do fator de crescimento transformador Beta
TGFβ1	Peptídeo multifuncional codificado pelo gene <i>TGFBI</i>
TIMPs	Inibidores Teciduais das Metaloproteinases
<i>TIMP2</i>	Inibidor Tecidual da Metaloproteinase 2
<i>TNC</i>	Tenascina C
<i>TNR</i>	Tenascina R

TNXA Tenascina XA

TNXB Tenascina XB

UNIFESP Universidade Federal de São Paulo

RESUMO

Introdução: O ombro congelado (OC) é uma doença altamente incapacitante, que provoca dor e restrição ativa e passiva dos movimentos do ombro, resultado de um intenso processo inflamatório, espessamento e fibrose da cápsula articular. Por definição, o ombro congelado primário ou idiopático não apresenta causa definida, de forma que os achados clínicos e agregações familiares nos levam a acreditar, fortemente, que fatores genéticos contribuam para o aparecimento dessa doença. Nossa hipótese foi de que variantes genéticas que codificam proteínas da matriz extracelular e genes envolvidos na homeostase da matriz extracelular, podem contribuir para a suscetibilidade ao ombro congelado. **Objetivo:** Verificar a associação entre polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) e OC em um estudo caso-controle. **Métodos:** Dezoito SNPs e variáveis clínicas foram avaliados em 186 casos e 600 controles pareados por idade. Os SNPs selecionados estavam em genes que codificam colágenos (*COL1A1 rs1800012*, *COL5A1 rs3196378* e *rs12722*), glicoproteínas (*FN1 rs6728999*, *TNC rs2104772*) genes envolvidos na sinalização do fator de crescimento transformador β 1 e seu receptor (*TGFBI rs1800470* e *rs1800469*, *TGFBR1 rs1568785* e *rs1590*), metaloproteinases (*MMP2 rs243865 rs2285053* e *rs243866*, *MMP3 rs679620* e *rs522616*, *MMP9 rs17576* e *rs17577*, *MMP13 rs2252070*) e seus inibidores (*TIMP2 rs2277598*). Foram realizadas regressões logísticas multivariadas usando idade, sexo, ancestralidade genética e comorbidades comuns como covariáveis. **Resultados:** Os portadores do alelo C de *rs2252070* da metaloproteinase 13 (*MMP13*) e do haplótipo G/G (*rs17576 / rs17577*) da metaloproteinase 9 (*MMP9*) podem ter risco aumentado de OC ($p=0.002$, OR=1.64 e $p=0.046$, OR= 1.40, respectivamente), especialmente nas mulheres ($p=0.005$, OR=1.91 e $p=0.046$, OR=1.59, respectivamente).

Nesse sexo, alelo G de rs17576 de *MMP9* tende a contribuir para a suscetibilidade à doença ($p=0.05$, $OR=1.51$). Em contrapartida, nos homens, a presença do alelo C de rs1800470 de *TGFBI* parece ser um fator protetor ($p=0.04$, $OR=0.47$) e o genótipo GG de rs1590 de *TGFBRI* parece ser um fator de risco ($p=0.027$, $OR=4.11$) para o desenvolvimento de ombro congelado no sexo masculino. **Conclusão:** Os achados reforçam o caráter multifatorial do ombro congelado com influência de variantes genéticas em genes que codificam proteínas envolvidas na homeostase da matrix extracelular da cápsula e da via de sinalização de $TGF\beta 1$. Enquanto nos homens identificamos associação de polimorfismos de *TGFBI* e *TGFBRI*, nas mulheres as metaloproteinases *MMP2* e *MMP9* foram apontadas como fatores de risco para desenvolvimento de OC. Apenas a *MMP13* esteve relacionada com ambos os sexos.

ABSTRACT

Introduction: Frozen shoulder is a disabling condition that causes pain and loss of active and passive motion of the shoulder as a result of intensive inflammatory contracture, thickening and fibrosis of the joint capsule. By definition, the primary or idiopathic frozen shoulder has no definite cause, so that clinical findings and familial aggregation make us believe that genetic factors may contribute to the development of this disease. We hypothesize that genetic variants that encode extracellular matrix proteins and genes involved in extracellular matrix homeostasis such as collagens, glycoproteins, genes involved in *TGFBI* signaling and its receptor *TGFBRI*, metalloproteinases and its inhibitors, may contribute to the susceptibility to frozen shoulder. **Objective:** Evaluate the association between simple nucleotide polymorphisms (SNPs) and frozen shoulder in a case-control study. **Methods:** Eighteen SNPs of genes that encode extracellular matrix proteins or genes involved in extracellular matrix homeostasis were evaluated in 186 cases of frozen shoulder and 600 age-matched controls. The selected SNPs were in genes encoding collagen (*COL1A1* rs1800012, *COL5A1* rs3196378 and rs12722), glycoproteins (*FNI* rs6728999, *TNC* rs2104772) genes involved in the signaling of transforming growth factor Beta- 1 and its receptor (*TGFBI* rs1800470 and rs1800469, *TGFBRI* rs1568785 and rs1590), metalloproteinases (*MMP2* rs243865, rs2285053 and rs243866, *MMP3* rs679620 and rs522616, *MMP9* rs17576 and rs17577, *MMP13* rs2252070) and their inhibitors (*TIMP2* rs2277598). Multivariate logistic regressions were carried out with age, gender, genetic ancestry and common comorbidities as covariates. **Results:** Carriers of the C allele of rs2252070 of *MMP13* and G/G haplotype (rs17576/rs17577) of *MMP9* may have an increased risk of frozen shoulder (p=0.002, OR=1.64 and p=0.046,

OR: 1.40, respectively), especially in females ($p=0.005$, OR=1.91 and $p=0.046$, OR=1.59, respectively). In this gender, the G allele of rs17576 of *MMP9* tended to contribute to the susceptibility to the studied disease ($p=0.05$, OR=1.51). By contrast, in males, the presence of the C allele of rs1800470 of *TGFBI* seems to be a protective factor ($p=0.04$, OR=0.47) and the GG-genotype of rs1590 of *TGFBR1* seems to be a risk factor ($p=0.027$, OR=4.11) for frozen shoulder development. **Conclusion:** The findings reinforce the multifactorial aspect of frozen shoulder with the influence of genetic variants on genes encoding proteins involved in capsular extracellular matrix homeostasis and the *TGFBI* signaling pathway. While in men we identified the association of *TGFBI* and *TGFBR1*, in women the *MMP2* and *MMP9* metalloproteinases were identified as risk factors for development of frozen shoulder. Only *MMP13* was related to both genders.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O ombro congelado (OC) é uma doença de etiologia desconhecida que atinge entre dois e 5% da população em geral (HSU *et al*, 2011), e se manifesta clinicamente por dor intensa e restrição global ativa e passiva dos movimentos do ombro, o que a torna altamente incapacitante. Trata-se de uma doença autolimitada que passa por três estágios clínicos: “congelamento”, “congelado” e “descongelamento ou resolução”, que refletem uma sequência de processos de inflamação capsular e fibrose até a cura gradativa e espontânea (HAND *et al*, 2007). A doença pode apresentar curso arrastado, entretanto, o tratamento é quase sempre clínico, ficando o procedimento cirúrgico indicado em casos refratários ao tratamento conservador (REEVES, 1975, HAND *et al*, 2008).

A fisiopatologia desse processo é caracterizada por inflamação e fibrose. Histologicamente é observado por hiperplasia sinovial, desequilíbrio entre a síntese e degradação do colágeno com deposição de uma densa matriz de colágenos tipo I e III povoada por fibroblastos e miofibroblastos, com acentuada neoformação vascular subjacente (BUNKER, ANTHONY, 1995, KRIEG, ABRAHAM, LAFYATIS *et al*, 2007). Macroscopicamente e por artroscopia, quando realizada, é vista como área de intensa hiperemia e espessamento substancial da cápsula articular, que pode ser evidenciado nas imagens de ressonância magnética (RM), principalmente no recesso axilar e intervalo rotador (SONG *et al*, 2011).

A causa do OC é desconhecida. No entanto, acredita-se que se trata de uma doença de caráter multifatorial, resultante da combinação de fatores externos e herança genética. O histórico familiar positivo é descrito em 9,5%

até 20% dos casos [COHEN, EJNISMAN, 2015 - (ANEXO 1), HAND *et al*, 2005] e a estimativa de herdabilidade de 42% (HAKIM *et al*, 2003), reforçam a provável influência genética de padrões complexos (interação gene-ambiente).

Uma possível forma de avaliar os fatores genéticos envolvidos nas doenças são estudos de polimorfismos e DNA. Dentro de uma espécie, os cromossomos homólogos são 99,5% similares entre si, e nas outras localizações do cromossomo (*loci*) pode haver variabilidade na sequência do DNA (FEUK *et al*, 2006). Se a variação é encontrada em uma frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo. Polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) surgem a partir de mudanças em nucleotídeos únicos de uma determinada sequência de DNA codificante, podendo originar aumento ou diminuição dos níveis de proteína (interferência com a estabilidade do RNA). SNPs são os mais frequentes tipos de polimorfismos e são uniformemente distribuídos por todo o genoma, tornando-os excelentes marcadores para avaliar a contribuição potencial de um determinado gene para uma doença complexa (THOMPSON, THOMPSON, 2002). Desta forma, em estudos de associação, comparam-se as frequências alélicas de genes candidatos entre populações de doentes e saudáveis. Nosso grupo demonstrou previamente que na cápsula de indivíduos com OC ocorre alteração da expressão de genes envolvidos na estrutura e homeostase da matriz extracelular (MEC) (COHEN *et al*, 2016, ANEXO 2). Dessa forma identificamos a importância de estudos de padrões genéticos como polimorfismos em genes da MEC para avaliação de susceptibilidade e esclarecimento sobre os mecanismos etiopatogênicos da doença.

No presente estudo foram estudados 18 polimorfismos funcionais em genes do colágeno tipo 1 (*COL1A1 rs1800012*), colágeno tipo 5 (*COL5A1 rs3196378* e *rs12722*), fibronectina 1 (*FNI rs6728999*), tenascina C (*TNC rs2104772*), fator de crescimento transformador Beta1 (*TGFB1 rs1800470* e *rs1800469*), receptor 1 do fator de crescimento transformador Beta 1 (*TGFBRI rs1568785* e *rs1590*), metaloproteinases 2, 3, 9 e 13 (*MMP2 rs243865*, *rs2285053* e *MMP2 rs243866*) (*MMP3 rs679620* e *rs522616*) (*MMP9 rs17576* e *rs17577*) (*MMP13 rs2252070*) e inibidor tecidual da metaloproteinase 2 (*TIMP2 rs2277598*), que acreditamos estarem funcionalmente relacionados com o fenótipo estudado. Dessa forma, buscase identificar potenciais marcadores genéticos relacionados à doença, que poderão contribuir para melhor compreensão, futuras políticas de prevenção e tratamento individualizado.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Identificar fatores genéticos relevantes para ombro congelado.

2.2 Objetivo Secundário

Comparar frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas de 18 polimorfismos de genes da MEC entre casos e controles.

Testar se a associação desses polimorfismos difere entre os sexos.

3 LITERATURA

3 LITERATURA

3.1 Definição de Ombro Congelado

O ombro congelado (OC) é uma condição clínica comum que acomete a articulação glenoumeral, causando dor intensa e limitação da amplitude de todos os movimentos do ombro. Por ter um curso insidioso e história clínica pouco marcante, é difícil definir a incidência exata, pois muitos pacientes não procuram atendimento médico e, muitos médicos desconhecem o diagnóstico, mas, em geral, afeta entre dois a 5% da população, com uma leve predileção pelo sexo feminino (HSU *et al*, 2011) e corresponde a 20% dos ombros rígidos (GREY, 1978). O pico de incidência ocorre entre 40 e 60 anos (NEVIASER, HANNAFIN, 2010) e história familiar positiva pode estar presente em até 20% dos casos (FEUK *et al*, 2006). Apresenta três fases de evolução que se sobrepõe, sendo elas “congelamento” (com duração entre dois e nove meses), “congelada” (entre quatro e 12 meses) e “descongelamento” ou “resolução” (entre 12 e 42 meses) e, está associada, muitas vezes, à dor severa, privação de sono, ansiedade e perda de movimento, que podem ser perturbadoras em vários aspectos da vida diária, como incapacidade para higiene pessoal, pentear cabelos e se vestir (REEVES, 1975, JONES *et al*, 2013). Essa condição costuma ter duração média de 30,1 meses, com intervalo entre um mês e 3,5 anos (REEVES, 1975), ou o curso pode ser ainda mais prolongado, restando alguma dor residual após cinco anos (HAND *et al*, 2007).

Ainda que a cura gradativa e espontânea possa acontecer, é possível abreviar a longa e dolorosa evolução da doença com medidas terapêuticas enérgicas e precoces em uma abordagem multidisciplinar (LECH, SUDBRACK, VALENZUELA NETO, 1993). Entre elas, uso de analgésicos

potentes por via oral, antiinflamatórios não hormonais por via oral, corticóides de ação prolongada por via intramuscular e intraarticular, antidepressivos de acordo com necessidade do paciente (GODINHO *et al*, 1995; FERREIRA FILHO, 2005), bloqueios seriados do nervo supra-escapular (CHECCHIA *et al*, 2006) e tratamento fisioterápico intensivo e persistente (GODINHO, SAMPAIO, 2000). Nos casos mais graves, que mostram pouco, ou nenhum progresso, na recuperação da mobilidade com o tratamento conservador, estão indicados procedimentos cirúrgicos como distensão hidrática da cápsula articular, manipulação do ombro sob anestesia geral (OGILVIE-HARRIS *et al*, 1995, ANDERSEN *et al*, 1998) e tratamento cirúrgico para abertura da cápsula articular por via artroscópica, com bons resultados (GODINHO, FREITAS, 2000, COHEN *et al*, 2013, MYIAZAKI *et al*, 2017).

Historicamente, a doença foi descrita em 1872, por DUPLAY, como anquilose fibrosa do ombro e, em 1896, como uma periartrite escapuloumeral (DUPLAY, 1872; DUPLAY, 1896). CODMAN, em 1934, criou o termo ombro congelado para denominar os casos de rigidez dolorosa do ombro, de longa duração e de início muitas vezes relacionado com períodos de imobilização ou de desuso da articulação. Descreveu a doença como “*difícil de definir, difícil de tratar e difícil de explicar*” (CODMAN, 1934). NEVIASER, em 1945, criou o termo capsulite adesiva a partir de achados histológicos e inflamatórios com presença de fibrose e aderências da cápsula às estruturas circunvizinhas (NEVIASER, 1945).

Desde então, várias definições e classificações foram propostas. O consenso da *American Shoulder and Elbow Surgeons* define como “*uma condição de etiologia incerta, caracterizada por significativa restrição de*

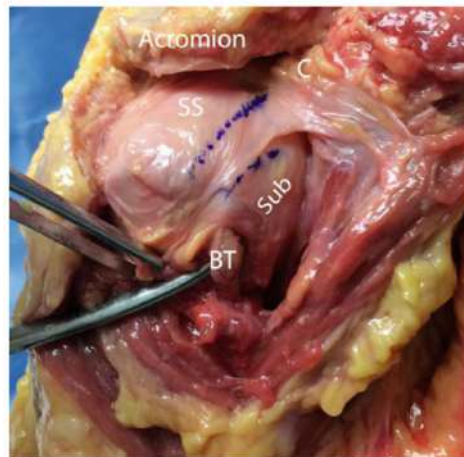
movimento ativo e passivo do ombro, que ocorre na ausência de uma desordem intrínseca conhecida do ombro". A classificação proposta por ZUCKERMAN *et al* (2011) chama o ombro congelado de capsulite adesiva e a divide em: a) primária, ou idiopática, quando não há causa aparente; b) secundária, quando se identifica uma possível causa ou há associação com outras doenças. A secundária pode ser: 1) intrínseca, quando é desencadeada por lesão no próprio ombro (tendinites do manguito rotador, tenossinovite da cabeça longa do bíceps, bursite, artrose acromioclavicular); 2) extrínseca, quando há associação com alterações de estruturas distantes do ombro, tais como lesões do membro superior (fraturas do punho e mão, infecções), doenças do sistema nervoso central e periférico (AVC, epilepsia, lesão de nervos do membro superior), lesões da coluna cervical com ou sem radiculopatia, doenças do coração (isquemia do miocárdio) e do pulmão (doença pulmonar crônica, tumores do ápice do pulmão); 3) sistêmica, quando há associação com doenças como o diabetes melito, doenças da tireóide, entre outras (ZUCKERMAN, ROKITO, 2011).

O consenso mais recente publicado pelo Comitê de Membros Superiores da *International Society of Arthroscopy Knee and Orthopedic Surgery (ISAKOS)*, desencoraja o uso do termo amplamente utilizado "*capsulite adesiva*", e define ombro rígido como um termo global que abrange qualquer restrição de amplitude de movimento do ombro, sendo classificado, de acordo com a etiologia, em ombro congelado (ou primário idiopático) e secundário (associados a trauma, cirurgia ou doença específica do próprio ombro como lesão do manguito rotador, fraturas, tendinite calcárea) - (ITOI *et al*, 2016). Desta forma, o termo ombro congelado (OC) que aparece nessa tese, será usado, exclusivamente, para descrever casos de ombro rígido primário idiopático que se desenvolveram sem história de

trauma local ou doença específica do ombro, além de incluir pacientes com doenças associadas, mas que não possuem relação causal direta com a rigidez (diabete melito, doenças da tireoide, doença de *Dupuytren*, entre outras).

3.2 Anatomia da Cápsula Glenoumeral e achados no Ombro Congelado

O complexo capsuloligamentar na articulação glenoumeral consiste em uma fina cápsula contínua ao lábio glenoidal e reforçada por espessamentos dos ligamentos glenoumerais superior (LGUS), médio e inferior (LGUI) e do ligamento coracoumeral (LCU) - (CHEN, PHADNIS, 2015). O intervalo rotador (IR), é uma região ligamentar triangular da cápsula compreendida entre a borda anterior do músculo supraespinhal e a borda superior do músculo subescapular, limitado medialmente pelo processo coracoide. Esse espaço é formado, do plano mais profundo para o superficial: LGUS, cápsula articular do intervalo rotador e LCU (JOST, KOCH, 2000, SAVOIE, COHEN, FAUST, 2015), (Figura 1).



Fonte: SAVOIE, COHEN, FAUST (2015), autorizada pelos autores.

Figura 1. Vista anterolateral do intervalo rotador de ombro direito, delimitado pelo trajeto em azul limitando bordas dos músculos supraespinhal (SS) e subescapular (Sub) e que se estende do processo coracoide (C) até a borda medial do tendão da cabeça longa do biceps (BT).

Macroscopicamente e por artroscopia, quando realizada, essa área é vista com intensa hiperemia e espessamento substancial da cápsula articular (Figura 2).



Figura 2. Imagem artroscópica do ombro direito, demonstrando à esquerda a glenóide e à direita evidenciando região anterior da cápsula articular espessada e hiperemiada diante do quadro de ombro congelado.

No OC essas são as principais estruturas envolvidas, e por serem restritores da translação inferior e da rotação externa do úmero, a contratatura dessas estruturas resulta em acentuada limitação desses movimentos (NEER 2nd *et al*, 1992).

O diagnóstico de OC é iminentemente clínico e as radiografias não apresentam alterações; entretanto, a ressonância magnética (RM) pode apontar alguns achados sugestivos da doença e, principalmente, apontar os diagnósticos diferenciais como lesão do manguito rotador, osteoartrose glenoumeral e osteoartrite acromioclavicular. Entre os achados mais frequentemente encontrados na RM estão, nessa ordem: espessamento do LCU, espessamento da cápsula articular e membrana sinovial no IR e recesso axilar, obliteração parcial ou total da gordura subcoracóide, distensão da bursa dentro do recesso subescapular superior e sinovite em torno do tendão da cabeça longa do bíceps (RYAN *et al*, 2016, SONG *et al*. 2011).

A região anterior da cápsula costuma ser a mais acometida no ombro congelado primário (RYAN *et al*, 2016). Entretanto, amostras da região anterior, posterior, superior e inferior da cápsula de quatro pacientes com OC indicam que existe fibroplasia em todas as regiões (UHTHOFF, BOILEAU, 2007).

3.3 Fisiopatologia, etiopatogenia e comorbidades associadas ao Ombro Congelado

Os três estágios clínicos referidos previamente (“congelamento”, “congelado” e “descongelamento”) refletem uma sequência de processos de inflamação capsular e fibrose até a resolução espontânea desta fibrose (HAND *et al*, 2007).

A fibrose sinovial é caracterizada pela proliferação de fibroblastos e um desequilíbrio entre a síntese e degradação do colágeno (KRIEG *et al*, 2007). Este desequilíbrio resulta em deposição excessiva de colágeno na matriz extracelular (MEC), levando ao espessamento e enrijecimento da membrana sinovial, que pode ser um dos principais contribuintes para a limitação de movimento e dor nas articulações rígidas (REMST *et al*, 2015).

Estudos histológicos evidenciaram que o processo fisiopatológico subjacente ao OC envolve inflamação, hiperplasia sinovial, deposição de uma densa matriz de colágeno de tipo I e tipo III povoada por fibroblastos e miofibroblastos com acentuada neoformação vascular subjacente e alterações degenerativas da matriz colágena da cápsula articular com moderado infiltrado linfo-histiocitário (BUNKER, ANTHONY, 1995; FERREIRA FILHO, 2005), que é modulado por mediadores, incluindo citocinas inflamatórias (LHO, HA, CHO *et al*, 2013), fatores de crescimento, tais como TGF β 1 (COHEN *et al*. 2016) - (ANEXO 2), fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento de hepatócitos (RODEO *et al*, 1997, BUNKER *et al*, 2000), metaloproteinases de matriz (MMPs) e inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) - (OGILVIE-HARRIS, MYERTHALL, 1997, HANNAFIN, CHIAIA, 2000, BUNKER *et al*, 2000, RYU *et al*, 2006, RYAN *et al*, 2016).

Apesar dos achados, não se sabe ao certo o que desencadeia esse processo. Diversas doenças foram ligadas à presença do OC, porém a relação de causa e efeito entre elas ou a simples associação não é clara. Entre elas podemos citar o diabetes melito (DM) - (ZREIK, MALIK, CHARALAMBOUS, 2016), doenças da tireóide (SCHIEFER *et al*, 2017), doença de *Dupuytren* (DD) – (BUNKER, ANTHONY, 1995, SMITH,

DEVARAJ, BUNKER, 2001), obesidade, dislipidemia (KINGSTON *et al*, 2018), pós-operatório de cirurgia cardíaca, colocação de marcapasso, imobilismo, depressão (MILGROM *et al*, 2008), câncer de mama (YANG *et al*, 2017), entre outras; entretanto, a forma exata como estão relacionadas, não está bem esclarecida. As três primeiras condições são as que apresentam maior número de publicações na literatura. Enquanto o DM está associado com risco aumentado em cinco vezes para o desenvolvimento de OC (JABEROO *et al*, 2007), maior frequência de bilateralidade (TIGHE, OAKLEY Jr, 2008), curso mais severo e arrastado da doença e idade mais jovem de acometimento (ZREIK *et al*, 2016), as doenças da tireoide se mostraram como fator de risco específico para OC, principalmente em mulheres (MILGROM *et al*, 2008) e foi demonstrada relação entre os níveis de TSH, com bilateralidade e severidade do OC (SCHIEFER *et al*, 2017). CAKIR *et al* (2003) estudaram pacientes com doenças da tireóide e encontraram OC em 10,9% dos pacientes e doença de *Dupuytren* em 8.8%. A contratura de *Dupuytren* (DD) é a comorbidade com associação mais curiosa em relação a etiopatogenia de OC, visto que ela se trata de uma doença benigna fibroproliferativa progressiva que afeta o tecido conjuntivo na fáscia palmar, levando ao enrijecimento do tecido semelhante ao que ocorre com a cápsula no OC. Foram relatadas grandes semelhanças histológicas entre o processo de fibrose das duas doenças (HAND *et al*, 2007, BUNKER, ANTHONY, 1995).

A DD tem características de doença complexa, multifatorial com forte componente genético conhecido (GEOGHEGAN *et al*, 2004; BECKER *et al*, 2014) e herdabilidade relatada de até 80% (LARSEN *et al*, 2015).

A influência de fatores genéticos na DD foi avaliada por meio do

agrupamento familiar (HU *et al*, 2005) estudo populacional de prevalência (FINSEN, DALEN, NESHEIM, 2002), estudos genômicos (MICHOU *et al*, 2012) e estudos de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) - (DOLMANS *et al*, 2011). Em dois estudos, o risco de DD foi encontrado entre 2,9 e 4,5 vezes maior em indivíduos com um irmão afetado do que na população geral e, história familiar positiva foi observada em 41% e 47% dos pacientes com DD (CAPSTICK *et al*, 2013, HINDOCHA *et al*, 2006). WILLIAMS *et al* (2015) mostraram pela primeira vez em um amplo estudo com 9718 gêmeos, uma associação entre condições fibróticas (ombro congelado e doença de *Dupuytren*), rigidez articular e artroplastias totais, mesmo após o ajuste de fatores de risco conhecidos, como idade e índice de massa corpórea (IMC) (ANTONY *et al*, 2015). Houve aumento de três a quatro vezes na correlação intraclasse em gêmeos monozigóticos em comparação com gêmeos dizigóticos para artroplastia total das articulações e rigidez articular, com herdabilidade estimada em 46% e 32%, respectivamente. Condições fibróticas apresentaram herdabilidade de 28%. Esses achados são sugestivos de uma influência genética em um processo comum de doença subjacente que afeta os tecidos conjuntivos.

3.4 Bases genéticas do ombro congelado

A hereditariedade contribui para muitas doenças humanas comuns na população, como, por exemplo, defeitos congênitos, infarto do miocárdio, câncer, doenças mentais, diabetes melito e grande parte das doenças ortopédicas. Embora as doenças ortopédicas até possam ser causadas por uma mutação em um único gene em algumas famílias, em geral, elas não são monogênicas. A maioria dessas afecções resulta de interações complexas entre vários fatores de predisposição, como os genótipos de diferentes *loci* e

uma variedade de fatores ambientais que ativam, aceleram ou exacerbam o processo da doença. Assim, essas doenças, como o ombro congelado, não podem ser enquadradas em padrões de herança mendelianos, mas sim em padrões complexos ou multifatoriais (interação gene-ambiente). Uma característica das doenças complexas é que elas podem apresentar agregação familiar, pois é mais provável que os parentes de uma pessoa afetada compartilhem com ela mais alelos de predisposição à doença do que pessoas não-aparentadas. Estudos prévios apontam história familiar positiva em 9,5% até 20% dos pacientes com OC (COHEN, EJNISMAN, 2015, FEUK *et al*, 2005) (ANEXO 1).

A contribuição de fatores genéticos para o aparecimento de OC foi sugerida em um estudo com 865 gêmeos monozigóticos e 963 dizigóticos usando o registro *TwinsUK* por HAKIM *et al* (2003) que apresentaram prevalência de OC de 11,6% e estimativa de herdabilidade de 42%. A associação entre OC e epicondilite lateral nesse grupo ocorreu entre duas e três vezes mais frequente, do que ao acaso, em indivíduos em geral. Outro estudo relata o caso de irmãos monozigóticos com ombro congelado bilateral desenvolvido ao mesmo tempo (HIRSCHHORN, SCHMIDT, 2000). A concordância em gêmeos idênticos é uma importante informação para a hipótese de que um caráter quantitativo depende de um componente genético. Essas evidências levam a crer que exista influência genética associada à suscetibilidade ao OC e, dessa forma, o estudo da base genética-molecular pode ajudar na melhor compreensão dos mecanismos biológicos da doença com possível impacto na prática clínica.

3.4.1 Bases moleculares da cápsula articular

A cápsula do ombro é composta de elementos celulares e fibrosos. As fibrilas de colágeno dos tipos I, III e V são os tipos mais comuns presentes na matriz extracelular (MEC) da cápsula do ombro (KALTSAS, 1983). Variantes nos genes do colágeno podem alterar a estrutura primária do mesmo gerando cadeias menos estáveis do que o normal (BAKER *et al*, 1989) e dessa forma podem afetar a estrutura capsular.

Desde que a diferenciação e função das células são dependentes de mediadores inflamatórios, torna-se importante estudar os fatores genéticos que determinam a expressão desses elementos biológicos. As citocinas, como o TGF β 1, podem desempenhar um papel fundamental nos processos inflamatórios e fibróticos que ocorrem no OC (RODEO *et al*, 1997). O TGF β 1 é ativado e mediado por receptores de sinalização, como o receptor I do TGF β (codificado pelo gene *TGF β 1*) (MOORE-SMITH, PASCHE, 2011), e regula várias proteínas da MEC, incluindo colágenos, FN1 e TNC (CHIQUET-EHRISMANN, TUCKER, 2011, COHEN *et al*, 2016), (ANEXO 2). As duas últimas são glicoproteínas que, por sua vez, atuam na modulação do TGF β (DALLAS *et al*, 2005).

Por fim, as metaloproteinases da matriz (MMPs) são proteases dependentes do zinco responsáveis pela remodelação tecidual e pela degradação da MEC durante processos fisiológicos normais como proliferação celular, remodelação de tecidos, reprodução, diferenciação, angiogênese e apoptose, mas também participam em doenças como artrite, invasão tumoral, câncer e inflamação (FU *et al*, 2015; RADENKOVIC *et al*, 2014, YAN *et al*, 2014). Essas enzimas são classificadas com base em sua preferência de substrato, incluindo collagenases (por exemplo, MMP1 e

MMP13), estromelizinas (por exemplo, MMP3) e gelatinases (por exemplo, MMP2 e MMP9) - (WOESSNER Jr, 1994). MMPs são inibidas por uma classe de proteínas chamada TIMP, incluindo TIMP2 (MITTAL *et al*, 2016). LUBIS, LUBIS (2013) demonstraram níveis séricos significativamente reduzidos de MMPs e aumentado de TIMPs e TGFB1 em pacientes com OC. HUTCHINSON *et al* (1998) acreditam que o desenvolvimento da doença se dá pelo desequilíbrio na proporção MMPs:TIMPs, cuja redução leva ao aumento da síntese e deposição de colágeno na matriz.

Esses são alguns dos fatores envolvidos na homeostase da MEC que parecem contribuir para a susceptibilidade genética ao OC e discorremos sobre os genes selecionados para o estudo individualmente, frisando evidências que sugerem suas participações.

3.4.1.1 Genes codificadores de colágeno

3.4.1.1.1 Genes envolvidos na fibra de colágeno tipo I: *COL1A1*

O colágeno tipo I, dentre todos os tipos de colágeno, é o mais abundante e encontrado na maioria dos tecidos de conexão sendo, preferencialmente, sintetizado em ossos, e que forma 90% da matriz extracelular óssea, derme e tendões por dois tipos de células: os osteoblastos e os fibroblastos (KARSENTY, PARK, 1995).

O gene *COL1A1*, localizado na região genômica 17q21.33, codifica as cadeias pro- $\alpha 1$ do colágeno tipo I. A expressão do colágeno tipo I está aumentada em várias formas de fibroses, tais como pulmonar, hepática e da medula óssea (KARSENTY, PARK, 1995). Mutações em genes de colágeno I tem sido descritas em diferentes doenças genéticas.

Em uma extensa revisão, MARINI *et al* (2007) identificaram 832 mutações independentes nos genes do colágeno 1 (493 no *COL1A1*). Um terço das mutações que resultam em substituições de glicina no *COL1A1* foram letais, enquanto que substituições nos 200 primeiros resíduos foram não letais e não relacionados com a aumento ou a diminuição da expressão MARINI *et al* (2007). Mutações de *COL1A1* estão associadas com doenças tais como a osteogênese imperfeita (OI) tipo I-IV, a síndrome *Ehlers-Danlos* (EDS), a doença de *Caffey* e a osteoporose idiopática (STARMAN *et al*, 1989; D'ALESSIO *et al*, 1991; GRANT *et al*, 1996; KAMOUN-GOLDRAT *et al*, 2008). A maioria das mutações no *COL1A1* altera a estrutura primária do colágeno, já algumas outras, resultam em um alelo nulo de *COL1A1* e, embora só metade da quantidade normal do pró-colágeno tipo I torna-se sintetizada, a sua estrutura é normal. Quase todas as moléculas que contêm cadeias com mutações em genes do colágeno tipo I são menos estáveis do que as cadeias normais (BAKER *et al*, 1989).

Variantes genéticas comuns (polimorfismos de DNA) no gene *COL1A1* parecem ser potenciais fatores genéticos de risco para diferentes doenças, incluindo lesões ortopédicas, tais como as roturas do ligamento cruzado anterior (LCA) e luxações do ombro (KHOSCHNAU *et al*, 2008). COLLINS, POSTHUMUS, SCHEWELINUS (2010), juntando os resultados de indivíduos caucasóides da África do Sul e Suíça, investigaram se um polimorfismo no sítio de ligação Sp1 de *COL1A1* estava associado ao risco de lesão do ligamento cruzado anterior do joelho, instabilidade de ombro e roturas do tendão de Aquiles. Os autores descreveram que o genótipo TT do polimorfismo funcional do primeiro íntron do gene *COL1A1*, era um fator protetor para lesão do tendão de Aquiles. O mesmo resultado foi obtido

quando todas as lesões foram combinadas e comparadas a indivíduos controles.

POSTHUMUS *et al*, em 2009, também demonstram que um polimorfismo de *COL1A1* (rs180012) era fator protetor para lesão do LCA em uma população caucasóide da África do Sul, porém não identificaram associação entre esse polimorfismo e rotura do tendão de Aquiles (POSTHUMUS *et al*, 2009b). Em uma população da Suécia, rs1800012 foi associado ao risco de lesão do LCA e instabilidade de ombro (KHOSCHNAU *et al*, 2008).

WANG *et al* (2017) realizaram uma metanálise contemplando seis estudos para avaliar a associação entre o polimorfismo rs1800012 de *COL1A1* com lesões esportivas tendíneas e ligamentares e, concluíram, que ele está associado à redução de risco de lesões, especialmente do LCA e que presença do alelo raro TT parece ser fator protetor.

Em 2014, BELANGERO *et al*, demonstraram que expressão de *COL1A1* e a razão *COL1A1/COL1A2* estavam aumentadas em todas as regiões (anterossuperior, anteroinferior e posterior) da cápsula, em pacientes com instabilidade anterior traumática do ombro, quando comparados aos controles e, essa razão, parece reduzir na região anteroinferior quanto maior o tempo de sintomas da doença. A razão entre *COL1A1/COL5A1* também estava aumentada na região anteroinferior e posterior da cápsula. Esses achados apontam um papel de genes de colágenos na instabilidade de ombro, além de outras afecções ortopédicas associadas à mobilidade das articulações (BELANGERO *et al*, 2014).

3.4.1.1.2 Gene de Colágeno tipo V: *COL5A1*

O gene *COL5A1* está localizado em 9q34.2 e sintetiza uma cadeia alfa para um dos colágenos fibrilares de baixa abundância, o colágeno V. A maior isoforma de colágeno V é um heterotrímero constituído por duas cadeias de $\alpha 1$ (produto do gene *COL5A1*) e uma de $\alpha 2$ (produto do gene *COL5A2*), porém algumas isoformas podem conter uma cadeia $\alpha 3$ (produto do gene *COL5A3*) (GREENSPAN *et al*, 1992).

O colágeno tipo V, que constitui aproximadamente 10% do conteúdo de colágeno nos ligamentos (NIYIBIZI *et al*, 2000), se intercala nas fibrilas do núcleo do colágeno tipo I. Esse colágeno parece estar envolvido na organização e na regulação das fibras de colágeno tipo I (NIYIBIZI *et al*, 2000). Também está fortemente relacionado ao colágeno tipo XI e é possível que as cadeias de colágeno dos tipos V e XI constituam um único tipo de colágeno com combinações de cadeia tecido-específicas.

O colágeno tipo V é encontrado em tecidos que contêm colágeno tipo I e parece regular a organização das fibras heterotípicas compostas de ambos colágenos, tipo I e tipo V (FICHARD, KLEMAN, RUGGIERO, 1995). Mutações em genes codificantes de colágeno tipo V também estão associadas a EDS, tipos I e II e VII (NICHOLLS *et al*, 1996). Um recente estudo realizado com sequenciamento de nova geração identificou diversas variantes nunca antes descritas no gene *COL5A1* em 177 pacientes portadores de EDS não aparentados (WEERAKKODY *et al*, 2016).

Lesões articulares são condições complexas e por isso, é improvável que uma única variante genética esteja associada ao seu risco (SEPTEMBER *et al*, 2007). O gene *COL5A1* já foi associado como um fator de risco

genético para as roturas do LCA (SEPTEMBER *et al*, 2007) e para instabilidade anterior traumática do ombro nos quais ocorre expressão reduzida de *COL5A1* na região anteroinferior, considerada região afetada da cápsula glenoumeral nesses pacientes (BELANGERO *et al*, 2014). O polimorfismo (rs12722) do gene *COL5A1* foi associado à tendinopatia de Aquiles crônica em populações da África do Sul (MOKONE *et al*, 2006) e Austrália (SEPTEMBER *et al*, 2009).

3.4.2.1 Genes relacionados com a modulação da síntese de fibras de colágeno: *TGFB1* e *TGFBRI*

O gene *TGFB*, localizado em 19q13.2, codifica o peptídeo multifuncional TGF β que controla a proliferação, a diferenciação e outras funções em muitos tipos de células. TGF β também atua como um fator de crescimento autócrino negativo. A desregulação da ativação de sinalização de *TGFB* pode resultar em apoptose (LEHNERT *et al*, 1988).

Muitas células sintetizam o peptídeo TGF β e quase todas elas possuem receptores específicos (EBNER *et al*, 1993). Vários tipos de ligantes de proteínas TGF β foram detectados na superfície da célula. Os receptores tipos I e II são definidos com base na mobilidade dos seus produtos de ligação cruzada em géis desnaturantes. Estes receptores medeiam a maioria das atividades de TGF β sendo que o receptor de tipo I (*TGFBRI*) medeia a indução de vários genes envolvidos em interações célula-matriz (EBNER *et al*, 1993). O gene *TGFBRI*, mapeado em 9q22.33, codifica um receptor de serina/treonina quinase para TGF β 1 e a ativação desses receptores leva à estimulação de proteínas reguladoras da expressão gênica.

A resposta inflamatória é normalmente a resposta mais precoce na reparação tecidual, seguida pela deposição de nova matriz de tecido conectivo. O aumento na transformação do fator de crescimento TGF β 1 acompanha a fase de inflamação aguda e parece agir como sinal de modulação da produção de macromoléculas de matriz por células fibrogênicas no local de lesão tecidual (SAKAI *et al*, 2002).

Algumas manifestações da síndrome de *Marfan* refletem a sinalização excessiva pela família TGF β de citocinas. HABASHI *et al*, em 2006, mostraram que o aneurisma aórtico num modelo de rato da síndrome de *Marfan* está associada com o aumento da sinalização de TGF β . Na doença de *Dupuytren*, já foi descrito aumento da expressão de *TGFBI* e de seu receptor *TGFBR1*, além da associação desse gene com fibrose e acúmulo de matriz densa de colágeno do tipo I e III. BIANCHI *et al*, em 2015, demonstraram forte expressão de *TGFBI*, na matriz extracelular e no citoplasma de fibroblastos e miofibroblastos dos tecidos nodulares extraídos na fibromatose palmar de indivíduos com *Dupuytren*, em comparação com tecido controle. *TGFBR1* também foi descrito como elemento fundamental na regulação da cicatrização tecidual (LIU *et al*, 2011) com papel crucial no desenvolvimento de doenças como a fibrose hepática (YOSHIDA *et al*, 2014) e a fibrose intersticial pulmonar (ZAGAI *et al*, 2007). Pacientes com luxação anterior do ombro recorrente apresentaram maior expressão de *TGFBR1* na parte anteroinferior da cápsula articular do ombro estando esta diretamente correlacionada com a duração dos sintomas (BELANGERO *et al*, 2016).

No OC foi demonstrado por meio de imunohistoquímica (técnica de imunoperoxidase) com anticorpos monoclonais, aumento da coloração

positiva para $TGF\beta 1$ e do receptor na sinóvia e cápsula articular dos pacientes (RODEO *et al*, 1997), e em estudos de expressão genética, o aumento de *TGFB* e *TGFBR1* no tecido capsular acometidos (LUBIS, LUBIS, 2013). Essa hiperregulação de *TGFBR1* se mostrou diretamente relacionada à duração dos sintomas de OC sugerindo que a sinalização de $TGF\beta$ deve estar envolvida no desenvolvimento da doença (COHEN *et al*, 2016).

3.4.3.1 Genes codificadores de glicoproteínas da matriz extracelular

Outros componentes não-colágenos de MEC de ligamentos/tendões, cápsula ou retináculo são pouco estudados. Em ligamentos/tendões e meniscos, as principais proteínas não-colágenas são as glicoproteínas fibronectina, tenascina e proteínas oligoméricas da matriz da cartilagem (COMP) (RILEY, 2010).

3.4.3.1.1 Gene da fibronectina-1: *FNI*

O gene *FNI*, localizado na região 2q35, codifica a fibronectina-1, proteína pertencente a uma família de glicoproteínas de elevado peso molecular que está presente na superfície das células, em fluidos extracelulares, os tecidos conjuntivos e de membranas basais. Fibronectinas interagem com outras proteínas de MEC e ligantes celulares, tais como o colágeno, a fibrina, e integrinas e estão envolvidas em processos adesivos e migratórios de células.

Uma das principais funções da fibronectina (FN) é na adesão de células aos materiais extracelulares, tais como substratos sólido e matrizes. BING *et al*, em 1982, mostraram que ela se liga a C1q, da mesma maneira que se liga colágeno (BING *et al*, 1982). Uma vez que a FN estimula a

endocitose e promove a eliminação de material em partículas a partir da circulação, BING *et al*, em 1982, sugeriram sua participação na depuração de material C1q-revestidos, tais como complexos imunes ou detritos celulares. A FN desempenha papel na regulação do TGF β (DALLAS *et al*, 2005.). Seu envolvimento em lesões do ombro foi previamente demonstrado por BELANGERO *et al*, em 2016, que identificou que a expressão de *FNI* estava aumentada na região cápsula anteroinferior dos pacientes com instabilidade anterior traumática do ombro, com mais de um ano de sintomas e com deslocamentos recorrentes em relação aos controles, e, simultaneamente, COHEN *et al*, demonstraram aumento da expressão de mRNA de *FNI* no tecido da cápsula de oito pacientes operados de OC, em comparação com indivíduos controles, sugerindo que a FN é um possível marcador de lesão capsular do ombro (COHEN *et al*, 2016) (ANEXO 2).

3.4.3.1.2 Gene da tenascina C: *TNC*

Tenascinas são proteínas da matriz extracelular com distribuição de tecido, espacialmente e temporalmente restrita. No embrião, está presente no mesênquima em torno do epitélio em desenvolvimento, em tendões, e no desenvolvimento de cartilagem e osso. No adulto, ele continua presente nos tendões e junções miotendíneas no pericôndrio e periósteo, bem como no músculo liso (PEARSON *et al*, 1988). As tenascinas estão envolvidas nos processos de morfogênese, migração e crescimento de diversos órgãos e tecidos. Apresentam papel na modulação da ação do TGF β e também são reguladas por ele (CHIQUET-EHRISMANN, TUCKER, 2011).

As tenascinas formam uma família de grandes proteínas multiméricas de matriz extracelular. Foram identificados três membros dessa família em humanos: tenascina R (TNR), tenascina C (TNC) e tenascina X tipo A e B

(TNXA e TNXB). O gene *TNXA* corresponde a um segmento duplicado de *TNXB* indo do íntron 32 ao éxon 45. A expressão da proteína TNR é restrita ao cérebro, enquanto TNC e TNX são expressas em diferentes órgãos (ZWEERS *et al*, 2004). No presente estudo, somente TNC será abordada.

O gene *TNC*, que codifica a TNC, está mapeado em 9q33.1. TNC é uma glicoproteína da MEC especificamente expressa em áreas de inflamação e lesão tecidual e foi apontada como responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias em articulações acometidas por artrite reumatóide (MIDWOOD *et al*, em 2009). A expressão do gene da *TNC* está localizada predominantemente em regiões responsáveis por transmitir altos níveis de força nos tendões e ligamentos e é regulada por carga mecânica.

Em tendões, a TNC, assim como a fibronectina, atua no processo de reparo por promover migração de fibroblastos e adesão destes às fibrilas. RILEY *et al*, em 1996, descreveram um aumento da expressão de *TNC* em amostras com rotura do tendão do manguito rotador (N=10) comparadas a amostras de tendão sadio (N=13 de nove cadáveres). Em lesões do tendão calcâneo, variantes do gene *TNC* foram associadas ao aumento do risco de lesão e podem, dessa forma, contribuir para o remodelamento de matriz alterado em tendinopatias (MOKONE *et al*, 2005). Verificou-se que um polimorfismo de dinucleotídeo de repetição GT dentro do intron 17 do gene *TNC* está associado à tendinopatia crônica e à ruptura do tendão calcâneo (JARVINEN *et al*, 2003).

MIDWOOD *et al*, em 2009, descobriram que ratos sem *TNC* não mostraram sinovite, infiltrado celular ou perda de peptídeo-glicanos em cartilagem e foram protegidos contra a destruição articular induzida por

albumina do soro bovino metilada. Esses achados reforçam sua participação nos processos inflamatórios.

No ombro, a expressão de *TNC* mostrou-se possível marcador de alterações capsulares. Na instabilidade traumática anterior, sua expressão se encontra alterada no tecido da cápsula de pacientes acometidos, de forma que o número de episódios de luxações podem modificar a expressão *TNC*, particularmente na porção anteroinferior (macroscopicamente afetada) e posterior (BELANGERO *et al*, 2016). Já no OC, foi demonstrado aumento da expressão de mRNA de *TNC* nos fragmentos de cápsula acometidos pela doença (COHEN *et al*, 2016) podendo estar envolvida no processo de inflamação e migração dos fibroblastos (ANEXO 2).

3.4.4.1 *Metaloproteinases e seus inibidores*

3.4.4.1.1 *MMP2*

É uma enzima do tipo gelatinase A que é codificada pelo gene *MMP2*, localizado no cromossomo 16, na posição 12.2. Ela faz parte do processo de digestão de uma série de moléculas da MEC, entre elas, colágenos tipo IV, V e XI, laminina e proteína do núcleo de agregan. A MMP-2 também digere os colágenos I, II e III de maneira semelhante às colagenases (AIMES, QUIGLEY, 1995).

A atividade colagenolítica da MMP-2 é mais fraca do que a MMP-1, mas como o proMMP-2 é recrutado para a superfície celular pode expressar atividade razoável sobre ou perto da superfície. A MMP-2 (juntamente com a MMP-9) é capaz de degradar o colágeno tipo IV, o componente mais abundante da membrana basal, a qual é importante para manter a organização do tecido, fornecendo suporte estrutural para as células e

influenciando a sinalização e polaridade celular. A degradação da membrana basal é um passo essencial para a progressão metastática da maioria dos cânceres (GIALELI, THEOCHARIS, KARAMANOS, 2011), e por essa razão, a MMP-2 tem sido amplamente estudada em cânceres humanos e mostrou-se intimamente relacionada ao potencial invasivo e metastático de diferentes tipos de células tumorais, incluindo câncer de pulmão (ALILABIB *et al*, 2014).

LUBIS, LUBIS, em 2013, relataram diminuição dos níveis de MMP2 em pacientes com OC, estando de acordo com BUNKER, ANTONY (1995) que demonstraram diminuição moderada de expressão de mRNA de *MMP1* e *MMP2* em tecido capsular de indivíduos com OC, semelhante à doença de *Dupuytren*.

A metaloproteinase 14 (MMP14) é uma proteína de membrana que não circula no sangue periférico, no entanto, ela desempenha papel chave na ativação de MMP2. Autores reportaram a expressão de mRNA de *MMP14* presente em 50% do tecido de controle, mas ausente nos tecidos de ombros congelados (BROWN, KELLY, McINNES, 2008).

3.4.4.1.2 *TIMP2*

É o gene que codifica uma proteína multifuncional de 21 kDa que atua como inibidor de tecido da MMP2 prevenindo quebra da matriz extracelular, frequentemente observada em doenças crônicas. *TIMP2* diminui o nível de proliferação celular mediada pelo fator de crescimento *in vitro*, bem como a neoangiogênese e o crescimento tumoral *in vivo*, independentemente da sua atividade inibidora de MMP (CHOWDHURY *et al*, 2017).

Os TIMPs são os inibidores específicos e reguladores da atividade das MMP (MANDAL *et al*, 2003) de forma que mudanças no nível TIMP2 podem afetar o nível MMP2 e o balanço MMP/TIMP (ULRICH, HRYNYSCHYN, PALLUA, 2003).

LUBIS, LUBIS, em 2013, investigaram níveis séricos de MMPs, TIMPs e TGF β 1 em OC e indivíduos normais usando método ELISA. Os níveis basais de MMP1 e MMP2 foram significativamente menores, enquanto os níveis TIMP1, TIMP2 e TGF β 1 foram significativamente maiores no grupo OC que nos controles, achados semelhantes aos distúrbios fibroproliferativos na DD (ULRICH *et al*, 2003). A relação MMP/TIMP do grupo OC foi muito menor do que o grupo controle, sugerindo que este cenário pode contribuir com fibrose capsular. Esse desbalanço também foi evidenciado em pacientes com fibrose capsular pós implante mamário (ULRICH *et al*, 2004).

Em 2008, BROWN *et al*, quantificaram os níveis de MMPs e TIMP1 em linhagens de células de fibroblastos e observaram diferenças marcantes quando os fibroblastos de pacientes diabéticos com OC foram comparados ao grupo controle. O cálculo das proporções de MMP1 / TIMP1 revelou índices significativamente mais baixos em OC com ou sem diabetes em comparação com os controles. MMP7, 9, 12 e 13 não foram detectadas em nenhuma das amostras. Eles concluíram que o OC primário produz menos MMPs e tem uma relação MMP / TIMP menor que os controles. Essas deficiências na produção de MMP1 podem refletir uma capacidade alterada para a remodelação local do tecido (BROWN *et al*, 2008).

3.4.4.1.3 MMP3

Também chamada de estromelisina-1, o gene da *MMP3* fica alocado no cromossomo 11 e codifica a proteína MMP3, um regulador-chave da MEC que é capaz de degradar colágeno tipos II, IV e IX, elastina, proteoglicanos e fibronectina, entre outras proteínas extracelulares, além de ativar outras MMPs (BIRKEDAL-HANSEN *et al*, 1993, SOMERVILLE *et al*, 2003). Essa enzima é produzida por vários tipos de células, como: fibroblastos, células musculares lisas, macrófagos, células sinoviais e condrócitos (CONSTANTIN *et al*, 2002), mas também pode ser observada nas lesões marginais de processos invasivos (KUSUKAWA *et al*, 1995), em células epiteliais durante o processo de reparação tecidual (MADLENER *et al*, 1998) e cicatrização de feridas (Di COLANDREA *et al*, 1998) e, em conjunto com outras MMPs, é amplamente expressa na lesão aterosclerótica (HENNEY *et al*, 1991). A expressão da *MMP3* é primariamente regulada transcricionalmente com o promotor desse gene respondendo a diversos estímulos, incluindo fatores de crescimento, citocinas, promotores de tumor e oncogenes, entre outros (BUTTICE *et al*, 1991). Assim, a expressão de *MMP3* também pode ser induzida em resposta às condições locais, como a carga mecânica (LEONG *et al*, 2010) e inflamação (ITOI *et al*, 1996). Sua produção é de extrema importância para a ativação da cascata latente de pró-MMPs, como a pró-MMP1, 8, 9, e 13 (KAHARI, SAARIALHO-KERE, 1999). A redução da expressão de *MMP3* foi apontada em cartilagem de indivíduos com osteoartrite, na tendinopatia degenerativa e na doença de Dupuytren (HUANG *et al*, 2017).

KANBE *et al*, em 2009, usando imunohistoquímica quantitativa, documentou aumento da expressão de *MMP3* nos tecidos vasculares e

sinoviais. Depois, os mesmos utilizaram a técnica de PCR quantitativa para mostrar níveis de expressão aumentados de *MMP3* e seu papel como mediador fibrogênico em um grupo com OC em comparação com grupo controle (KANBE *et al*, 2009, KABBABE, RAMKUMAR, RICHARDSON, 2010). XU *et al*, relataram que fatores genéticos podem estar envolvidos na etiologia ao examinarem polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) em *MMP3* e concluíram que o aumento da expressão da variante de *MMP3* rs650108 estava significativamente associada à susceptibilidade de OC em uma população Han chinesa (XU *et al*, 2016).

3.4.4.1.4 MMP9

A MMP9 é uma proteinase de função mista produzida por um grande número de células como uma proenzima com uma massa molecular de 92 kDa em humanos (ATKINSON, SENIOR, 2003). A clivagem proteolítica da MMP9 produz a enzima ativa, que, por sua vez, pode degradar um grande número de substratos. A deleção dirigida de *MMP9* em ratos resulta em animais que retardaram o crescimento de ossos longos e alteraram a migração epitelial (VU *et al*, 1998). Camundongos que não possuem MMP9 exibem a cicatrização tardia da ferida, e a MMP9 induziu a migração de fibroblastos cardíacos e a secreção de colágeno e citocinas (WANG *et al*, 2011).

Estudos sugerem que a MMP9 pode desempenhar um papel fundamental na modulação da reorganização tecidual mediada pela atividade contrátil dos fibroblastos e que esse efeito é devido à geração de TGF β 1 endógeno liberado e ativado pela MMP9 (PERNG *et al*, 2011, KOBAYASHI *et al*, 2014, YU, STAMENKOVIC, 2000). Alternativamente, a MMP9 poderia estimular a contração e esta poderia levar à ativação do

TGF β , bem como este pode modular a liberação de MMP9. Isso aumenta a possibilidade de que a MMP9 e o TGF β pudessem participar de um ciclo de retroalimentação positivo dependente da contração que regula a função dos fibroblastos (OVERALL, WRANA, SODEK, 1989). A MMP9 (gelatinase B) está presente em baixos níveis no pulmão saudável, mas está aumentada em várias doenças pulmonares, incluindo asma, fibrose pulmonar e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) - (SEGURA-VALDEZ *et al*, 2000, LEMJABBAR *et al*, 1999). Entre suas muitas funções, foi relatado que a MMP9 ativa o fator de crescimento transformador latente *TGFB* em sua forma ativa e induz a produção de TGF β em células epiteliais (LONGO *et al*, 2002). Como o TGF β estimula os fibroblastos, essas observações sugerem que a MMP9 desempenha um papel importante na remodelação tecidual que caracteriza muitas doenças pulmonares.

Além disso, a MMP9 está fortemente associada a efeitos anti-angiogênicos, derivados da sua capacidade de gerar inibidores da angiogênese (endostatina e tumostatina) e podem desempenhar um papel protetor em alguns tumores (YU, STAMENKOVIC, 2000, MARTIN, MATRISIIAN, 2007). *In vivo*, pode aumentar os níveis de endostatina em camundongos, diminuindo a densidade venosa e reduzir o crescimento tumoral e incidência de metástases (BENDRIK *et al*, 2008).

A fibronectina 1 (FN1) está entre as proteínas com um domínio de fibronectina tipo II que pode ser degradado por MMP9. No entanto, a FN1 também é capaz de induzir um aumento da expressão de *MMP9* (SEN *et al*, 2010).

A retroalimentação entre essas proteínas é importante para a remodelação tecidual, pois, nesse contexto, sugere-se que a MMP9 libere,

ou ative, várias citocinas e fatores de crescimento, incluindo o TGF β 1 (KOBAYASHI *et al*, 2014).

3.4.4.1.5 MMP13

A MMP13, importante metaloproteinase, do tipo colagenase, que cliva o principal componente estrutural da cartilagem, o colágeno tipo II, efetuando, assim, a perda irreversível da arquitetura e função da MEC. Altos níveis de expressão de *MMP13* foram relatados na doença degenerativa dos discos intervertebrais (LI *et al*, 2016, HUA *et al*, 2017) e, também, foi encontrado aumento da expressão da *MMP13* nas zonas profundas da cartilagem de pacientes com artrite reumatoide, sendo que esta protease parece ser a principal responsável pela degradação da matriz (DRINDA *et al*, 2002).

Um estudo demonstrou que o aumento da expressão da *MMP13* induzida por produtos finais de glicação avançada, em condrócitos de ratos, desempenha um papel na apoptose celular e avanço da osteoartrite (WENZHOU *et al*, 2017). Acredita-se que a MMP13, sintetizada pelos condrócitos, é a principal enzima causadora da osteoartrite (ROWAN *et al*, 2008).

O polimorfismo de *MMP13* (rs2252070), individualmente, foi apontado como possível contribuinte para a predisposição à tendinopatia do músculo tibial posterior (de ARAUJO MUNHOZ *et al*, 2016, *Erratum* 2017).

A expressão da colagenase *MMP13* se mostrou significativamente elevada, na amostra de tecido de nódulos dos pacientes operados para a doença de *Dupuytren*, onde ocorre elevado *turnover* do colágeno; entretanto,

elevados níveis de TIMP1 bloqueando a ação da MMP13, na quebra do colágeno, foi apontado como possível responsável pelo processo de contratura e fibrose nesses indivíduos (JOHNSTON *et al*, 2007).



4 MÉTODO

4 MÉTODO

4.1 Desenho do estudo

Estudo primário, transversal, do tipo caso-controle, realizado na Disciplina de Medicina Esportiva e Atividade Física do Departamento de Ortopedia e Traumatologia e na Disciplina de Genética do Departamento de Morfologia e Genética - Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O estudo faz parte do Projeto do Programa Especial Jovem Pesquisador da FAPESP sob no. 2011/22548-2, intitulado “*Afecções Ortopédicas não Traumática de Ombro: Aspectos Genéticos e Moleculares*”.

Este estudo seguiu as recomendações do *STrengthening the REporting of Genetic Association* (STREGA) (LITTLE, HIGGINS, IOANNIDIS *et al*, 2009).

4.2 Seleção de pacientes

Após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) 1918/11 (Apêndice 1), o estudo foi explicado e compreendido por um total de 786 indivíduos que aceitaram participar e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2). O grupo de casos foi composto, inicialmente, por 194 pacientes com ombro congelado ou história prévia desta doença, recrutados no ambulatório de ombro da UNIFESP no período entre 2012 e 2016. Foram incluídos pacientes que preencheram todos os critérios (Quadro I) e retirados do estudo pacientes de acordo com critérios de exclusão (Quadro II), restando 186 pacientes. Os critérios de não inclusão utilizados seguem descritos (Quadro III). Todos os pacientes apresentavam

ressonância magnética (RM) para confirmação diagnóstica de OC e, principalmente, para descartar o ombro rígido secundário.

QUADRO I- Critérios de inclusão

- História de dor e limitação ativa e passiva pelo menos um mês;
- Redução de pelo menos 50% da rotação externa, comparado ao contralateral;
- Radiografias sem anormalidades da articulação glenoumeral;
- Ressonância Magnética: espessamento capsular, principalmente no recesso axilar, ligamento coracoumeral e intervalo rotador e LGUI.

QUADRO II - Critérios de exclusão

- Ressonância Magnética com achados de OC secundário: fratura prévia, tendinopatia calcárea, lesão manguito rotador, luxação glenoumeral;
- Ausência ou insuficiência do sangue coletado.

QUADRO III- Critérios de não inclusão

- Não concordância com Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Acometimento prévio do ombro;
- Doenças sistêmicas reumatológicas;
- Doenças genéticas diagnosticadas.

O grupo controle foi formado por indivíduos recrutado nos outros Ambulatórios do CETE - Medicina Esportiva, no Laboratório Central da Disciplina de Medicina Laboratorial do Hospital São Paulo-UNIFESP e por voluntários membros da Marinha. Para esse estudo participaram indivíduos pareados por idade (± 1 ano), em uma proporção estimada de 1:3 casos:controles, resultando em um grupo de 600 indivíduos. Foram excluídos indivíduos com histórico de dor e afecções dos ombros; com história familiar de ombro congelado; com antecedentes de doenças fibróticas de outras articulações (por exemplo: artrofibrose do joelho, capsulite adesiva do quadril, doença de Dupuytren). Amostras insuficientes de sangue coletado também foram excluídas. Os critérios de não inclusão utilizados foram os mesmos (Quadro III).

4.3 Questionário e coleta de sangue periférico

Todos os 786 pacientes responderam a um questionário (Apêndice 3) em conjunto com o médico pesquisador, sobre sexo, idade, índice de massa corpórea, tabagismo, etilismo, uso de medicamentos, comorbidades clínicas como (hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes, tireoidopatias, câncer, doenças renais, doenças sistêmicas e psiquiátricas) e antecedentes familiares de doenças, no formato de heredograma, para que fosse lembrado cada membro até parentesco de segundo grau. O grupo OC respondeu além do questionário geral, um questionário para caracterização da doença (lado acometido, escala visual de dor, amplitude de movimento bilateral, duração da doença, tratamento realizado) (Apêndice 4). Na sequência foi realizada coleta de 8ml de punção venosa de sangue periférico da região do antebraço, armazenados em dois tubos de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

O material colhido foi encaminhado para o laboratório de Genética e estocado a 4°C até a etapa de extração de DNA.

4.4 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído das células brancas do sangue periférico utilizando *Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen, USA)*. A medição da concentração e da pureza de ácidos nucleicos das amostras foi determinada com auxílio do espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA)*. O DNA extraído foi estocado a -20°C até as subsequentes análises.

4.5 Ancestralidade Molecular

Para estudos de associação genética é importante eliminar variáveis de confundimento como a estrutura genética populacional evitando dessa forma resultados falsos positivos de achados que estejam ligados à uma subpopulação e não propriamente à doença estudada. Dessa forma, para evitar o viés de estratificação populacional com associações espúrias, inicialmente avaliamos a frequência de marcadores moleculares neutros em uma subpopulação das amostras, na qual determinamos a ancestralidade genética. A amostra necessária foi formada por 164 casos determinados aleatoriamente e 460 controles pareados por sexo, cuja idade era igual ou até dois anos maior do que os casos selecionados. Esta idade mais avançada foi utilizada nos controles porque eles estavam mais tempo expostos a possíveis fatores ambientais, que podem contribuir para o risco de desenvolvimento do ombro congelado, porém não desenvolveram a condição. Os indivíduos foram genotipados para um conjunto de 61 polimorfismos bialélicos de baixa inserção/deleção validados (INDELs), que são os polimorfismos mais

abundantes depois dos SNPs (HUANG *et al*, 2014), compreendendo até cerca de 8% de todos os polimorfismos humanos (WEBER *et al*, 2002), usando o equipamento ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e analisados pelo *software GeneMapper v3.2* (Applied Biosystems). O ABIGS LIZ- 500 *ladder* (Applied Biosystems) foram utilizadas como marcadores de referência de tamanho para identificação dos INDELS.

Os padrões de tamanhos conhecidos foram incluídos em cada ensaio para controle de qualidade. O modelo de miscigenação pressupõe que cada indivíduo herda uma parte de seus marcadores de populações ancestrais. Com base nesse pressuposto, os resultados foram baseados nas três populações parentais (africanas, ameríndias e européias) que constituem a população brasileira para realizar a estratificação de ascendência (Tabela 2).

4.6 Genotipagem

Foram genotipados 18 SNPs da MEC nos participantes:

- A) COLÁGENOS: (*COL1A1 rs1800012*) (*COL5A1 rs3196378* e *COL5A1 rs12722*)
- B) GLICOPROTEÍNAS: (*FNI rs6728999*) (*TNC rs2104772*)
- C) FATORES DE CRESCIMENTO E RECEPTOR: (*TGFB1 rs1800469* e *rs1800470*) (*TGFB1R rs1568785* e *rs1590*)
- D) METALOPROTEINASES E INIBIDORES: (*MMP2 rs243865*, *rs2285053* e *rs243866*) (*TIMP2 rs2277598*) (*MMP3 rs67962* e *rs522616*) (*MMP9 rs17576* e *rs17577*) (*MMP13 rs2252070*).

Os detalhes das variantes genéticas estudadas são mostrados na Tabela 1. Todos os SNPs selecionados se encontram em genes associados à estrutura e homeostase da MEC e / ou processo de fibrose. Os SNPs foram selecionados com base em pelo menos um dos seguintes critérios: ser funcional; anteriormente associado ao risco de doença/lesões ortopédicas; anteriormente associado ao risco de comorbidades que estão relacionadas com o desenvolvimento de OC. A frequência alélica menor (MAF) baseada no projeto de 1.000 genomas foi usada para os SNPs selecionados e para cada um deles, pudemos detectar um risco relativo de genótipo estimado entre 1,4 e 2,1 com 80% do poder esperado ao nível de significância de 5% em nossa amostra (http://csg.sph.umich.edu//abecasis/cats/gas_power_calculator/index.html). A amplificação e genotipagem dos SNPs foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real da 5' nuclease usando o sistema de discriminação alélica por sondas *TaqMan*, *Life Technologies*,

EUA) em um Sistema de PCR em tempo real *ViiA 7 (Life Technologies, EUA)* em um único centro. Amostras em branco e conhecidas, representativas de cada genótipo, foram incluídas em todas as execuções. A identificação de genótipo foi realizada usando o *TaqMan Genotyper Software (Life Technologies)*. As análises foram realizadas em réplicas simples; no entanto, novas réplicas foram realizadas quando possíveis dados de baixa qualidade foram detectados. A identificação de genótipos, bem como a análise de ancestralidade genética, foram realizadas por investigadores cegos aos dados clínicos durante as análises.

Tabela 1. Variantes genéticas estudadas e ensaios clínicos utilizados para a genotipagem.

Símbolo do gene	Nome do gene	SNP	Alelos	tipo de SNP	Alelo menor	MAF				Ensaio a
						Total	Africano	Americano	Europeu	
<i>COL1A1</i>	Cadeia de colágeno tipo alfa 1	rs1800012	C/A	Intron	A	0,091	0,064	0,124	0,189	C__7477170_30
<i>COL5A1</i>	Cadeia de colágeno tipo V alfa 1	rs3196378	C/A	3' UTR	A	0,325	0,112	0,438	0,582	C__370253_10
		rs12722	C/T	3' UTR	T	0,349	0,145	0,445	0,585	C__370252_20
<i>FNI</i>	Fibronectina 1	rs6728999	C/T	Missense	T	0,035	0,129	0,007	1	C__25592960_30
<i>TNC</i>	Tenascina C	rs2104772	T/A	Missense	A	0,481	0,601	0,476	0,45	C__16182844_10
<i>TGFB1</i>	Fator de crescimento transformador, beta 1	rs1800470	A/G	Missense	G	0,545	0,586	0,494	0,618	C__22272997_10
		rs1800469	G/A	Intron	A	0,632	0,782	0,537	0,688	C__8708473_10
<i>TGFBRI</i>	Fator de crescimento transformador, beta receptor 1	rs11568785	A/G	Intron	G	0,044	0,053	0,05	0,083	C__31646800_10
		rs1590	T/G	UTR 3'	G	0,33	0,302	0,281	0,253	C__2945143_10
<i>TIMP2</i>	Inibidor de metaloproteinase TIMP 2	rs2277698	C/T	Synonymous	T	0,169	0,101	0,12	0,125	C__15885241_10
<i>MMP2</i>	Matrix metalopeptidase 2	rs243865	C/T	Intron	T	0,137	0,029	0,236	0,259	C__3225943_10
		rs2285053	G/A	Intron	A	0,151	0,12	0,18	0,113	C__26734093_20
		rs243866	G/A	Intron	A	0,134	0,021	0,233	0,26	C__3225942_10
<i>MMP3</i>	Matrix metalopeptidase 3	rs679620	C/T	Missense	T	0,652	0,671	0,679	0,528	C__3047717_1_
		rs522616	T/C	Upstream	C	0,315	0,201	0,444	0,229	C__3047714_10
<i>MMP9</i>	Matrix metalopeptidase 9	rs17576	A/G	Missense	G	0,455	0,344	0,228	0,381	C__11655953_10
		rs17577	G/A	Missense	A	0,191	0,163	0,084	0,175	C__11655948_1_
<i>MMP13</i>	Matrix metalopeptidase 13	rs2252070	T/C	Upstream	C	0,636	0,719	0,648	0,701	C__25474083_10

MAF: frequência do alelo menor com base no relatório da fase 3 do projeto *1000 genomas* (1000G).

^aTaqMan Sonda para discriminação alélica (*Life Technologies*, USA).

4.7 Modelos

Designando o alelo de menor frequência (raro) como m e o alelo de maior frequência (selvagem) como M , a associação entre SNPs e ombro congelado foi avaliada nos seguintes modelos genéticos: A) $Mm + mm$ vs. MM para um modelo dominante do alelo m , em que a presença do alelo raro está envolvida no risco ou proteção de desenvolver ombro congelado; B) mm versus $mM + MM$ para um modelo recessivo do alelo m , onde a presença de duas cópias do alelo raro são necessárias para modificar o fenótipo; e C) amostras foram codificadas como 0 (MM), 1 (mM) ou 2 (mm) para o modelo aditivo do alelo menor. No modelo aditivo, indivíduos com duas cópias do alelo raro seriam mais suscetíveis à doença do que indivíduos com uma cópia; no entanto, indivíduos com uma cópia do alelo raro teriam um maior risco de doença do que indivíduos sem o alelo raro. Em todas as análises, o genótipo de homocigoto mais comum na população de controle foi definido como a categoria de referência.

4.8 Análise Estatística dos Resultados

O teste de *qui-quadrado* foi usado para comparar as variáveis de sexo, hábito tabagista/etilista e a presença de comorbidades clínicas entre pacientes com ombro congelado e controles. O teste *t-Student* para amostras independentes foi usado para comparar idade e ancestralidade genética entre casos e controles usando *software* SPSS v.18 (IBM, USA). As frequências de alelos e genótipos foram calculadas para polimorfismos, e o teste do *qui-quadrado* foi utilizado para investigar o desvio do Equilíbrio *Hardy-Weinberg* (EHW). O EHW supõe que existe independência de dois alelos em um locus e que as frequências genóticas em um locus genético são

estáveis dentro de uma geração. Dessa forma, desvios no EHW apontam para erros de genotipagem (XU *et al*, 2002, SALANTI *et al*, 2005).

A associação entre a relação caso-controle de cada SNP individual, medido pelo *odds ratio* (OR) e seu correspondente intervalo de confiança (IC) de 95%, foi estimado usando regressão logística incondicional.

Primeiro, a regressão logística foi realizada usando sexo e idade como covariáveis. Os valores de p geralmente são ajustados em estudos com o objetivo de identificar SNPs associados ao risco de lesões articulares, inclusive no estudo anterior com OC (XU *et al*, 2016).

Em segundo lugar, a ascendência européia e a ascendência africana foram incluídas como covariáveis, uma vez que esta correção é essencial para evitar o viés devido a uma associação entre um SNP e a ancestralidade genética em uma população miscigenada. Para evitar a multicolinearidade, a ascendência ameríndia não foi incluída no modelo porque poderia ser inferida com base nas porcentagens das outras duas ancestralidades.

Em terceiro lugar, a regressão logística foi realizada usando sexo, idade, ancestralidade genética, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, diabete e hipotireoidismo (a principal tireoidopatia em nossa população) como covariáveis. Essas covariáveis foram descritas anteriormente como fatores de risco epidemiológicos para OC e a frequência delas diferiu entre casos e controles.

Como etapa de validação, a regressão logística foi realizada para os SNP identificados como fatores preditivos independentes nas análises anteriores (ajustadas por ancestralidade genética) com todos os indivíduos recrutados (n = 786). Nesta etapa, sexo, idade e as principais comorbidades

foram incluídos como covariáveis. Um modelo final considerou mais de um SNP como um possível fator preditivo. Foi realizada correção de Bonferroni com objetivo de ajustar o valor de significância do teste baseado no número de comparações para diminuir a chance do erro tipo I.

Os modelos descritos acima também foram avaliados separadamente entre mulheres e homens. O desequilíbrio de ligação (LD) e as associações entre haplótipos de SNPs selecionados e o risco de ombro congelado foram estimados usando o *software SNPstat* (SOLE *et al*, 2006). Primeiro, os valores de p foram ajustados para sexo, idade e ancestralidade genética. Em seguida, os valores de p foram ajustados por sexo, idade e comorbidades nas análises envolvendo todos os sujeitos recrutados.

Para todas as análises, um valor p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Variáveis Clínicas e Ancestralidade genética

Os grupos OC e controles variaram em relação ao sexo, com prevalência do feminino no grupo OC (61,2% e 51,3%, respectivamente e $p=0,02$) e foram homogêneos em relação à idade (média de 52,7 e 53,5 anos, respectivamente) (Tabela 2). As condições médicas mais frequentes em casos e controles foram hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia, diabete melito (DM) e tireoidopatias, principalmente hipotireoidismo. A dislipidemia ($p < 0,001$) e o hipotireoidismo ($p < 0,001$) foram mais frequentes nos pacientes com OC do que nos controles (Tabela 2). Por outro lado, a HAS e DM, foram mais comuns nos controles ($p < 0,05$) (Tabela 2).

As mulheres com ombro congelado apresentaram aumento da frequência de dislipidemia e hipotireoidismo e menor incidência de HAS e DM em relação aos controles (todos $p < 0,001$) (Tabela 3). No entanto, apenas a frequência de dislipidemia foi significativamente maior entre homens com OC em relação aos controles ($p < 0,001$) (Tabela 3).

Homens com OC apresentaram maior frequência de HAS e DM do que mulheres ($p = 0,002$ e $p = 0,007$, respectivamente). Em contrapartida, a frequência de hipotireoidismo foi maior no sexo feminino com OC do que no masculino ($p = 0,004$) (Tabela 2). A prevalência de hipotireoidismo em OC foi de 27% e pacientes com tireoidopatias apresentaram frequência 2.69 vezes maior de OC.

Todos os indivíduos apresentavam ancestralidade genética mista. A ascendência européia era predominante em ambos os grupos, seguida de africanos e ameríndios (Tabela 2). Apenas 17 indivíduos tinham menos de

80% de ascendência europeia, africana e ameríndia, o que poderia resultar de outras ascendências populacionais, como as asiáticas.

Tabela 2. Distribuição das variáveis clínicas nos grupos ombro congelado (OC) e controle de todos os indivíduos e de indivíduos com dados de ancestralidade genética.

Variáveis	Total indivíduos (n=786)			Total de indivíduos com dados de ancestralidade genética (n=624)		
	Controles (n=600)	Casos (n=186)	Valor p	Controles (n=460)	Casos (n=164)	Valor p
Idade (anos; média ± DP)	53.49 ± 11.73	52.66 ± 9.04	0.373	54.49 ± 11.01	52.50 ± 9.27	0.039*
Sexo [n(%)]						
Feminino	308 (51.3)	114 (61.2)	0.02*	263 (57.2)	97 (59.1)	0.729
Masculino	292 (48.7)	72 (38.8)		197 (42.8)	67 (40.9)	
Ancest. genética (%; média ± DP)						
Origem africana	-	-		23 ± 21	10 ± 13	<0.001*
Origem ameríndia	-	-	-	11 ± 10	8 ± 6	<0.001*
Origem europeia	-	-		62 ± 24	75 ± 25	<0.001*
Hábitos tabagistas						
Não fumante	525 (87.5)	163 (87.7)		395 (85.9)	143 (87.2)	
Fumante	62 (10.3)	17 (9.1)	0.392	52 (11.3)	15 (9.1)	0.282
NI	13 (2.2)	6 (3.2)		13 (2.8)	6 (3.7)	
Hipertensão arterial [n(%)]						
Ausente	359 (59.8)	137 (73.7)	<0.001*	273 (59.3)	118 (71.9)	0.001*
Presente	230 (38.4)	43 (23.1)		176 (38.3)	40 (24.4)	

NI	11 (1.8)	6 (3.2)		11 (2.4)	6 (3.7)	
Dislipidemia [n(%)]						
Ausente	537 (89.5)	129 (69.4)		410 (89.1)	113 (68.9)	
Presente	52 (8.7)	51 (27.4)	<0.001*	39 (8.5)	45 (27.4)	<0.001*
NI	11 (1.8)	6 (3.2)		11 (2.4)	6 (3.7)	
Diabete [n(%)]						
Ausente	465 (77.5)	156 (83.9)		348 (75.6)	137 (83.5)	
Presente	124 (20.7)	24 (12.9)	0.012*	101 (22.0)	21 (12.8)	0.008*
NI	11 (1.8)	6 (3.2)		11 (2.4)	6 (3.7)	
Tireoidopatia [n(%)]						
Ausente	527 (87.8)	124 (66.7)		400 (87.0)	111 (67.7)	
Presente	62 (10.4)	57 (30.6)	<0.001*	49 (10.6)	48 (29.3)	<0.001*
NI	11 (1.8)	5 (2.7)		11 (2.4)	5 (3.0)	
Hipotireoidismo [n(%)]						
Ausente	554 (92.4)	142 (76.3)		419 (91.1)	128 (78.1)	
Presente	35 (5.8)	39 (21)	<0.001*	30 (6.5)	31 (18.9)	<0.001*
NI	11 (1.8)	5 (2.7)		11 (2.4)	5 (3.0)	

DP: Desvio Padrão; NI: não informado

* Diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$) para o *t-test* para amostras independentes (variáveis quantitativas) ou *X² test* (variáveis categóricas).

Na população estudada, o componente europeu foi mais frequente entre os casos do que os controles ($p < 0,001$). Em contraste, tanto os componentes ameríndios como africanos foram mais frequentes entre os controles ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 3. Distribuição das variáveis clínicas de todos indivíduos segundo sexo feminino ou masculino.

Variáveis	Total indivíduos (n=786)			Total Femininos (n=422)			Total Masculinos (n=364)		
	Controle (n=600)	Casos (n=186)	p-value	Controle (n=308)	Casos (n=114)	p-value	Controle (n=292)	Casos (n=72)	p-value
Idade (anos; média ± DP)	53.49 ± 11.73	52.66 ± 9.04	0,373	55.05 ± 10.62	52.52 ± 9.03	0,023*	51.84 ± 12.61	53.01 ± 9.12	0,456
Gênero [n(%)]									
Feminino	308 (51.3)	114 (61.2)	0,02*	-	-	-	-	-	-
Masculino	292 (48.7)	72 (38.8)		-	-	-	-	-	-
Ancestr genética (%; média ± DP)									
Origem africana	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Origem ameríndea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Origem americana	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hábitos tabagistas									
Não fumante	525 (87.5)	163 (87.7)	0,392	277 (90.0)	99 (86.9)	0,392	248 (85)	64 (88.9)	0,233
Fumante	62 (10.3)	17 (9.1)		26 (8.4)	11 (9.6)		36 (12.3)	6 (8.3)	
NI	13 (2.2)	6 (3.2)		5 (1.6)	4 (3.5)		8 (2.7)	2 (2.8)	
Pressão arterial [n(%)]									
Ausente	359 (59.8)	137 (73.7)	<0.001*	172 (55.8)	92 (80.7)	<0.001*	187 (64.0)	45 (62.5)	0,412
Presente	230 (38.4)	43 (23.1)		132 (42.9)	17 (14.9)		98 (35.6)	26 (36.1)	
NI	11 (1.8)	6 (3.2)		4 (1.3)	5 (4.4)		7 (2.4)	1 (1.4)	
Dislipidemia [n(%)]									
Ausente	537 (89.5)	129 (69.4)	<0.001*	276 (89.6)	84 (73.7)	<0.001*	261 (89.4)	45 (62.5)	<0.001*
Presente	52 (8.7)	51 (27.4)		28 (9.1)	25 (21.9)		24 (8.2)	26 (36.1)	
NI	11 (1.8)	6 (3.2)		4 (1.3)	5 (4.4)		7 (2.4)	1 (1.4)	
Diabetes [n(%)]									
Ausente	465 (77.5)	156 (83.9)	0,012*	238 (77.3)	101 (88.6)	<0.001*	227 (77.7)	55 (76.4)	0,397
Presente	124 (20.7)	24 (12.9)		66 (21.4)	8 (7.0)		58 (19.9)	16 (22.2)	
NI	11 (1.8)	6 (3.2)		4 (1.3)	5 (4.4)		7 (2.4)	1 (1.4)	
Tireoidopatia [n(%)]									
Ausente	527 (87.8)	124 (66.7)	<0.001*	267 (86.6)	63 (55.3)	<0.001*	260 (89.0)	61 (84.7)	0,262
Presente	62 (10.4)	57 (30.6)		37 (12.1)	47 (41.2)		25 (8.6)	10 (13.9)	
NI	11 (1.8)	5 (2.7)		4 (1.3)	4 (3.5)		7 (2.4)	1 (1.4)	
Hipotireoidismo [n(%)]									
Ausente	554 (92.4)	142 (76.3)	<0.001*	282 (91.6)	78 (68.4)	<0.001*	272 (93.1)	64 (88.9)	0,148
Presente	35 (5.8)	39 (21)		22 (7.1)	32 (28.1)		13 (4.5)	7 (9.7)	
NI	11 (1.8)	5 (2.7)		4 (1.3)	4 (3.5)		7 (2.4)	1 (1.4)	

DP: desvio padrão; NI: não informado

*Diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$) para *t-test* para amostras independentes (variáveis quantitativas) ou χ^2 test (variáveis categóricas).

2) SNPs e o risco de ombro congelado

Os alelos e os genótipos estavam em equilíbrio pelo EHW, com exceção de *COL1A1* rs1800012 e *COL5A1* rs12722, que se desviaram significativamente do equilíbrio na população estudada ($p = 0,027$ e $p = 0,015$; respectivamente) e principalmente nos controles ($p = 0,006$ e $p = 0,037$; respectivamente). Embora esses SNPs possam ser considerados em EHW se uma correção de Bonferroni fosse aplicada após comparações múltiplas, os resultados de rs1800012 e rs12722 devem ser considerados com cuidado.

As distribuições de genótipos dos SNPs estudados para os casos e controles são mostradas nas Tabela 4 (A-B-C), Tabela 5 (A-B-C), Tabela 6 e Tabelas 7 (A-B-C) e 8 (A-B-C). O SNP rs243865 de *MMP2* ($p=0.049$, $OR=1.39$, $95\%CI: 1.00-1.93$, modelo aditivo) e SNP rs522616 de *MMP3* ($p = 0,04$ $OR=0.45$, $95\%CI: 0.21-0.98$, modelo recessivo) foram associados ao desenvolvimento de OC quando ajustado para idade e sexo (Tabela 5 A-B-C). No entanto, nenhuma associação significativa entre esses SNPs e susceptibilidade à doença foi detectada após o ajuste para a ancestralidade genética. O alelo raro de rs2252070 de *MMP13* foi um fator de risco independente para a doença, inclusive em um modelo aditivo ajustado por sexo, idade, ancestralidade genética e principais comorbidades (Tabela 5C) ($p=0,002$, $OR=1.64$, $95\%IC: 1.20-2.26$). Portanto, os indivíduos homozigotos e heterozigóticos para o alelo C de rs2252070 podem estar em maior risco de desenvolver ombro congelado; no entanto, os portadores de genótipos CC são ainda mais suscetíveis. Este achado foi confirmado quando uma regressão logística multivariada foi realizada usando os dados de todos os pacientes recrutados (Figure 3A; Tabela 6)

Tabela 4A. Frequência de genótipos em todos indivíduos dos grupos casos (OC) e controles.

Gene	SNP	Genótipo	Todos indivíduos (Femininos + Masculinos)							
			Controles [n(%)]	Casos [n(%)]	Dominante		Recessivo		Aditivo	
					p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)
COL1A1	rs1800012	C/C	347 (75.4)	112 (68.3)						
		C/A	96 (20.9)	48 (29.3)	0.35	1.24 (0.79 - 1.95)	0.28	0.44 (0.98 - 1.98)	0.64	0.66 (0.80 - 0.50)
		A/A	17 (3.7)	4 (2.4)						
COL5A1	rs3196378	C/C	164 (35.7)	52 (31.7)						
		C/A	207 (45.1)	74 (45.1)	0.76	0.93 (0.59 - 1.47)	0.91	1.03 (0.63 - 1.68)	0.9	0.98 (0.73 - 1.31)
		A/A	88 (19.2)	38 (23.2)						
COL5A1	rs12722	C/C	154 (33.6)	51 (31.1)						
		C/T	203 (44.3)	74 (45.1)	0.57	0.87 (0.55 - 1.39)	0.79	0.94 (0.58 - 1.52)	0.61	0.93 (0.69 - 1.24)
		T/T	101 (22.1)	39 (23.8)						
FNI	rs6728999	C/C	427 (93.0)	164 (100)						
		C/T	32 (7)	0 (0)	0.99	-		-		-
TNC	rs2104772	T/T	114 (24.9)	52 (31.7)						
		T/A	237 (51.7)	81 (49.4)	0.12	0.69 (0.43 - 1.10)	0.56	0.86 (0.51 - 1.44)	0.18	0.81 (0.60 - 1.10)
		A/A	107 (23.4)	31 (18.9)						
TGFB1	rs1800470	A/A	100 (24.5)	51 (31.1)						
		A/G	219 (53.7)	78 (47.6)	0.23	0.75 (0.47 - 1.20)	0.61	1.15 (0.67 - 1.98)	0.62	0.92 (0.67 - 1.27)
		G/G	89 (21.8)	35 (21.3)						
TGFB1	rs1800469	G/G	151 (34.8)	66 (40.2)						
		G/A	224 (51.6)	71 (43.3)	0.31	0.80 (0.52 - 1.23)	0.4	1.28 (0.72 - 2.29)	0.78	0.96 (0.70 - 1.30)
		A/A	59 (13.6)	27 (16.5)						
TGFBRI	rs11568785	A/A	407 (88.9)	142 (86.6)						
		A/G	49 (10.7)	22 (13.4)	0.43	1.28 (0.69 - 2.37)	0.99	-	0.48	1.24 (0.68 - 2.26)
		G/G	2 (0.4)	0 (0)						
TGFBRI	rs1590	T/T	220 (48.0)	89 (54.3)						
		T/G	207 (45.1)	61 (37.2)	0.21	0.76 (0.50 - 1.16)	0.23	1.60 (0.74 - 3.47)	0.6	0.91 (0.65 - 1.28)
		G/G	31 (6.8)	14 (8.5)						
TIMP2	rs2277698	C/C	339 (80.7)	127 (77.4)						
		C/T	79 (18.8)	36 (21.9)	0.45	1.23 (0.72 - 2.08)	0.4	3.5 (0.19 - 65.77)	0.39	1.25 (0.75 - 2.08)
		T/T	2 (0.5)	1 (0.6)						
MMP2	rs243865	C/C	340 (73.9)	107 (65.2)						
		C/T	108 (23.5)	51 (31.1)	0.64	1.11 (0.71 - 1.74)	0.75	0.83 (0.27 - 2.59)	0.77	1.06 (0.72 - 1.55)
		T/T	12 (2.6)	6 (3.7)						
MMP2	rs2285053	C/C	326 (70.9)	120 (73.2)						
		C/T	126 (27.4)	41 (25)	0.39	0.82 (0.52 - 1.29)	0.84	1.16 (0.27 - 4.84)	0.48	0.86 (0.57 - 1.30)
		T/T	8 (1.7)	3 (1.8)						
MMP2	rs243866	G/G	340 (73.9)	108 (65.9)						
		G/A	108 (23.5)	50 (30.5)	0.73	1.08 (0.69 - 1.69)	0.75	0.83 (0.29 - 2.59)	0.85	1.04 (0.71 - 1.52)
		A/A	12 (2.6)	6 (3.7)						
MMP3	rs679620	C/C	171 (37.2)	53 (32.3)						
		C/T	212 (46.1)	84 (51.2)	0.79	1.06 (0.68 - 1.66)	0.38	0.78 (0.44 - 1.36)	0.76	0.96 (0.71 - 1.29)
		T/T	77 (16.7)	27 (16.5)						
MMP3	rs522616	T/T	231 (50.2)	88 (53.7)						
		T/C	182 (39.6)	68 (41.5)	0.89	1.03 (0.67 - 1.58)	0.09	0.46 (0.19 - 1.13)	0.52	0.89 (0.64 - 1.26)
		C/C	47 (10.2)	8 (4.9)						
MMP9	rs17576	A/A	221 (48)	71 (43.3)						
		A/G	197 (42.8)	73 (44.5)	0.1	1.43 (0.94 - 2.18)	0.68	1.14 (0.59 - 2.20)	0.16	1.25 (0.92 - 1.71)
		G/G	42 (9.1)	20 (12.2)						
MMP9	rs17577	G/G	340 (73.9)	130 (79.3)						
		G/A	111 (24.2)	34 (20.7)	0.28	0.76 (0.46 - 1.25)	0.99	-	0.21	0.74 (0.46 - 1.19)
		A/A	9 (2)	0 (0)						
MMP13	rs2252070	T/T	223 (48.5)	61 (37.2)						
		T/C	200 (43.5)	81 (49.4)	0.005*	1.85 (1.20 - 2.83)	0.05*	1.92 (1.00 - 3.67)	0.002*	1.64 (1.20 - 2.26)
		C/C	37 (8)	22 (13.4)						

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; ^avalor de p ajustado por idade, sexo, ancestralidade genética, hipertensão, dislipidemia, diabetes e hipotireoidismo. *Diferença significativa entre grupos; p<0.05. #Os grupos tendem a serem diferentes.

Tabela 4B. Frequência de genótipos nas mulheres dos grupos casos (OC) e controles.

Gene	SNP	Femininas							
		Controles [n(%)]	Casos [n(%)]	Dominante		Recessivo		Aditivo	
				p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)
COL1A1	rs1800012	209 (79.5)	67 (69.1)						
		44 (16.7)	27 (27.8)	0.61	1.18 (0.62 - 2.26)	0.77	0.77 (0.13 - 4.42)	0.74	1.10 (0.64 - 1.89)
		10 (3.8)	3 (3.1)						
COL5A1	rs3196378	88 (33.5)	29 (29.9)						
		119 (45.2)	47 (48.5)	0.63	0.85 (0.43 - 1.67)	0.52	0.80 (0.41 - 1.57)	0.49	0.29 (0.93 - 0.89)
		56 (21.3)	21 (21.6)						
COL5A1	rs12722	85 (32.4)	28 (28.9)						
		114 (43.5)	48 (49.5)	0.64	0.85 (0.42 - 1.69)	0.23	0.66 (0.34 - 1.29)	0.29	0.80 (0.53 - 1.21)
		63 (24.1)	21 (21.6)						
FNI	rs6728999	244 (92.8)	97 (100)	0.98					
		19 (7.2)	0 (0)						
TNC	rs2104772	63 (24.1)	31 (32)						
		133 (50.8)	48 (49.5)	0.49	0.80 (0.42 - 1.52)	0.61	0.83 (0.40 - 1.73)	0.46	0.85 (0.56 - 1.30)
		66 (25.2)	18 (18.6)						
TGFB1	rs1800470	60 (23.8)	27 (27.8)						
		133 (52.8)	50 (51.5)	0.86	1.06 (0.54 - 2.07)	0.71	0.88 (0.42 - 1.84)	0.93	0.98 (0.64 - 1.51)
		59 (23.4)	20 (20.6)						
TGFB1	rs1800469	83 (32.7)	37 (38.1)						
		134 (52.8)	46 (47.4)	0.86	0.95 (0.51 - 1.74)	0.67	0.83 (0.36 - 1.94)	0.73	0.93 (0.60 - 1.43)
		37 (14.6)	14 (14.4)						
TGFBRI	rs11568785	235 (89.3)	85 (87.6)						
		26 (9.9)	12 (12.4)	0.61	1.26 (0.52 - 3.05)	0.99		0.66	1.21 (0.52 - 2.83)
		2 (0.8)	0 (0)						
TGFBRI	rs1590	127 (48.5)	52 (53.6)						
		114 (43.5)	38 (39.2)	0.23	0.70 (0.39 - 1.25)	0.75	0.84 (0.29 - 2.41)	0.28	0.77 (0.49 - 1.23)
		21 (8)	7 (7.2)						
TIMP2	rs2277698	209 (82)	79 (81.4)						
		45 (17.6)	17 (17.5)	0.78	0.90 (0.43 - 1.89)	0.27	12.72 (0.13 - 1246.59)	0.95	0.98 (0.48 - 1.98)
		1 (0.4)	1 (1)						
MMP2	rs243865	188 (71.5)	63 (65)						
		66 (25.1)	30 (30.9)	0.5	0.81 (0.44 - 1.49)	0.78	0.81 (0.19 - 3.49)	0.53	0.84 (0.50 - 1.41)
		9 (3.4)	4 (4.1)						
MMP2	rs2285053	185 (70.5)	71 (73.2)						
		74 (28.1)	26 (26.8)	0.37	0.75 (0.39 - 1.41)	0.99		0.28	0.71 (0.39 - 1.31)
		4 (1.5)	0 (0)						
MMP2	rs243866	188 (71.5)	64 (66)						
		66 (25.1)	29 (29.9)	0.41	0.77 (0.42 - 1.42)	0.78	0.81 (0.19 - 3.48)	0.43	0.81 (0.48 - 1.36)
		9 (3.4)	4 (4.1)						
MMP3	rs679620	102 (38.8)	34 (35)						
		121 (46)	49 (50.5)	0.88	0.96 (0.52 - 1.75)	0.29	0.64 (0.29 - 1.45)	0.5	0.87 (0.57 - 1.32)
		40 (15.2)	14 (14.4)						
MMP3	rs522616	134 (51)	57 (58.8)						
		102 (38.8)	35 (36.1)	0.72	0.89 (0.49 - 1.64)	0.31	0.54 (0.16 - 1.77)	0.47	0.84 (0.52 - 1.35)
		27 (10.3)	5 (5.2)						
MMP9	rs17576	129 (49)	41 (42.3)						
		116 (44.1)	43 (44.3)	0.07	1.73 (0.96 - 3.13)	0.29	1.65 (0.65 - 4.14)	0.05 [#]	1.51 (0.97 - 2.33)
		18 (6.8)	13 (13.4)						
MMP9	rs17577	198 (75.3)	75 (77.3)						
		62 (23.6)	22 (22.7)	0.71	0.88 (0.44 - 1.75)	0.99		0.62	0.85 (0.44 - 1.64)
		3 (1.1)	0 (0)						
MMP13	rs2252070	125 (47.5)	35 (36.1)						
		115 (43.7)	45 (46.4)	0.036*	1.92 (1.04 - 3.53)	0.008*	3.27 (1.36 - 7.86)	0.005*	1.91 (1.22 - 2.99)
		23 (8.8)	17 (17.5)						

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; ^avalor de p ajustado por idade, sexo, ancestralidade genética, hipertensão, dislipidemia, diabetes e hipotireoidismo. *Diferença significativa entre grupos; p<0.05. [#]Os grupos tendem a serem diferentes.

Tabela 4C. Frequência de genótipos nos homens dos grupos casos (OC) e controles.

Gene	SNP	Masculino							
		Controles [n(%)]	Casos [n(%)]	Dominante		Recessivo		Aditivo	
				p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)
COL1A1	rs1800012	138 (70.1)	45 (57.2)						
		52 (26.4)	21 (31.3)	0.46	1.29 (0.66 - 2.49)	0.21	0.20 (0.02 - 2.52)	0.79	1.08 (0.60 - 1.94)
		7 (3.6)	1 (1.5)						
COL5A1	rs3196378	76 (38.8)	23 (34.3)						
		88 (44.9)	27 (40.3)	0.82	0.93 (0.48 - 1.79)	0.55	1.26 (0.59 - 2.64)	0.85	1.04 (0.68 - 1.60)
		32 (16.3)	17 (25.4)						
COL5A1	rs12722	69 (35.2)	25 (34.3)						
		89 (45.4)	26 (38.8)	0.47	0.78 (0.40 - 1.53)	0.47	1.30 (0.64 - 2.64)	0.97	0.99 (0.65 - 1.52)
		38 (19.4)	18 (26.9)						
FNI	rs6728999	183 (93.4)	67 (100)	0.99					
		13 (6.6)	0 (0)						
TNC	rs2104772	51 (26)	21 (31.3)						
		104 (53.1)	33 (49.3)	0.15	0.60 (0.30 - 1.20)	0.76	0.89 (0.42 - 1.89)	0.27	0.77 (0.49 - 1.22)
		41 (20.9)	13 (19.4)						
TGFB1	rs1800470	40 (25.6)	24 (35.8)						
		86 (55.1)	28 (41.8)	0.04*	0.47 (0.23 - 0.96)	0.42	1.41 (0.61 - 3.29)	0.35	0.79 (0.48 - 1.29)
		30 (19.2)	15 (22.4)						
TGFB1	rs1800469	68 (37.8)	29 (43.3)						
		90 (50)	25 (37.3)	0.14	0.61 (0.32 - 1.17)	0.17	1.80 (0.77 - 4.21)	0.74	0.93 (0.58 - 1.47)
		22 (12.2)	13 (19.4)						
TGFBRI	rs11568785	171 (88.2)	57 (85.1)						
		23 (11.8)	10 (14.9)	0.35	1.53 (0.63 - 3.70)				
TGFBRI	rs1590	-	-						
		93 (47.4)	37 (55.2)						
		93 (47.4)	23 (34.3)	0.34	0.73 (0.39 - 1.38)	0.027*	4.11 (1.17 - 14.38)	0.95	1.02 (0.60 - 1.73)
TIMP2	rs2277698	10 (5.2)	7 (10.4)						
		130 (78.8)	48 (71.6)						
		34 (20.6)	19 (28.4)	0.08	1.99 (0.92 - 0.43)	1		0.09	1.93 (0.091 - 4.13)
MMP2	rs243865	1 (0.6)	0 (0)						
		152 (77.2)	44 (65.7)						
		42 (21.3)	21 (31.3)	0.24	1.50 (0.76 - 2.97)	0.87	0.85 (0.12 - 5.92)	0.33	1.34 (0.74 - 2.44)
MMP2	rs2285053	3 (1.5)	2 (3)						
		141 (71.6)	49 (73.1)						
		52 (26.4)	15 (22.4)	0.7	0.87 (0.44 - 1.74)	0.19	2.91 (0.59 - 14.28)	0.92	1.03 (0.57 - 1.86)
MMP2	rs243866	4 (2)	3 (4.5)						
		152 (77.2)	44 (65.7)						
		41 (21.3)	21 (31.3)	0.24	1.50 (0.76 - 2.98)	0.87	0.85 (0.12 - 5.92)	0.33	1.34 (0.74 - 2.44)
MMP3	rs679620	3 (1.5)	2 (3)						
		69 (35)	19 (28.4)						
		91 (46.2)	35 (52.2)	0.67	1.16 (0.58 - 2.32)	0.83	0.92 (0.41 - 2.03)	0.87	1.04 (0.66 - 1.63)
MMP3	rs522616	37 (18.8)	13 (19.4)						
		97 (49.2)	31 (46.3)						
		80 (40.6)	33 (49.3)	0.71	1.13 (0.60 - 2.14)	0.21	0.40 (0.10 - 1.65)	0.81	0.94 (0.57 - 1.55)
MMP9	rs17576	20 (10.2)	3 (4.5)						
		92 (46.7)	30 (44.8)						
		81 (41.1)	30 (44.8)	0.6	1.19 (0.64 - 2.23)	0.61	0.82 (0.39 - 1.73)	0.79	1.07 (0.67 - 1.69)
MMP9	rs17577	24 (12.2)	7 (10.4)						
		142 (72.1)	55 (82.1)						
		49 (24.9)	12 (17.9)	0.34	0.69 (0.32 - 1.48)	0.99		0.3	0.67 (0.32 - 1.43)
MMP13	rs2252070	6 (3)	0 (0)						
		98 (49.7)	26 (38.8)						
		85 (43.1)	36 (53.7)	0.09	1.73 (0.92 - 3.26)	0.58	0.71 (0.22 - 2.30)	0.27	1.31 (0.81 - 2.13)
		14 (7.1)	5 (7.5)						

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; ^avalor de p ajustado por idade, sexo, ancestralidade genética, pressão alta, dislipidemia, diabetes e hipotireoidismo. *Diferença significativa entre grupos; p<0.05. #Os grupos tendem a serem diferentes.

Tabela 5A– Frequências de genótipos dos grupos casos (OC) e controles, ajustado por idade e sexo.

Gene	SNP	Genótipo	Controles [n(%)]	Casos [n(%)]	Ajustado por idade e sexo					
					Dominante		Recessivo		Aditivo	
					p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)
<i>COL1A1</i>	rs1800012	C/C	347 (75.4)	112 (68.3)						
		C/A	96 (20.9)	48 (29.3)	0,09	1.41 (0.95-2.09)	0,45	0.65 (0.22-1.97)	0,25	1.22 (0.87-1.69)
		A/A	17 (3.7)	4 (2.4)						
<i>COL5A1</i>	rs3196378	C/C	164 (35.7)	52 (31.7)						
		C/A	207 (45.1)	74 (45.1)	0,4	1.18 (0.80-1.73)	0,31	1.25 (0.81-1.93)	0,27	1.15 (0.90-1.47)
		A/A	88 (19.2)	38 (23.2)						
<i>COL5A1</i>	rs12722	C/C	154 (33.6)	51 (31.1)						
		C/T	203 (44.3)	74 (45.1)	0,68	1.09 (0.74-1.60)	0,69	1.09 (0.72-1.67)	0,62	1.06 (0.83-1.35)
		T/T	101 (22.1)	39 (23.8)						
<i>FNI</i>	rs6728999	C/C	427 (93.0)	164 (100)	0,99					
		C/T	32 (7)	0 (0)						
<i>TNC</i>	rs2104772	T/T	114 (24.9)	52 (31.7)						
		T/A	237 (51.7)	81 (49.4)	0,09	0.72 (0.48 - 1.06)	0,22	0.75 (0.48 - 1.18)	0,07	0.79 (0.61 - 1.02)
		A/A	107 (23.4)	31 (18.9)						
<i>TGFB1</i>	rs1800470	A/A	100 (24.5)	51 (31.1)						
		A/G	219 (53.7)	78 (47.6)	0,08	0.70 (0.46 - 1.05)	0,97	0.99 (0.63 - 1.55)	0,26	0.86 (0.66 - 1.12)
		G/G	89 (21.8)	35 (21.3)						
<i>TGFB1</i>	rs1800469	G/G	151 (34.8)	66 (40.2)						
		G/A	224 (51.6)	71 (43.3)	0,15	0.76 (0.52 - 1.11)	0,39	1.25 (0.76 - 2.05)	0,57	0.93 (0.71 - 1.21)
		A/A	59 (13.6)	27 (16.5)						
<i>TGFBRI</i>	rs11568785	A/A	407 (88.9)	142 (86.6)						
		A/G	49 (10.7)	22 (13.4)	0,47	1.22 (0.71 - 2.09)	0,99	-	0,59	1.15 (0.69 - 1.94)
		G/G	2 (0.4)	0 (0)						
<i>TGFBRI</i>	rs1590	T/T	220 (48.0)	89 (54.3)						
		T/G	207 (45.1)	61 (37.2)	0,16	0.77 (0.54 - 1.11)	0,41	1.32 (0.68 - 2.56)	0,44	0.89 (0.66 - 1.19)
		G/G	31 (6.8)	14 (8.5)						
<i>TIMP2</i>	rs2277698	C/C	339 (80.7)	127 (77.4)						
		C/T	79 (18.8)	36 (21.9)	0,3	1.27 (0.81 - 1.98)	0,86	1.25 (0.11 - 14.06)	0,31	1.25 (0.82 - 1.92)
		T/T	2 (0.5)	1 (0.6)						
<i>MMP2</i>	rs243865	C/C	340 (73.9)	107 (65.2)						
		C/T	108 (23.5)	51 (31.1)	0,045*	1.48 (1.01 - 2.18)	0,46	1.46 (0.54 - 3.97)	0,049*	1.39 (1.00 - 1.93)
		T/T	12 (2.6)	6 (3.7)						
<i>MMP2</i>	rs2285053	C/C	326 (70.9)	120 (73.2)						
		C/T	126 (27.4)	41 (25)	0,58	0.89 (0.60 - 1.33)	0,9	1.09 (0.28 - 4.22)	0,64	0.92 (0.64 - 1.32)
		T/T	8 (1.7)	3 (1.8)						
<i>MMP2</i>	rs243866	G/G	340 (73.9)	108 (65.9)						
		G/A	108 (23.5)	50 (30.5)	0,06	1.44 (0.98 - 2.12)	0,46	1.46 (0.54 - 3.97)	0,07	1.36 (0.98 - 1.89)
		A/A	12 (2.6)	6 (3.7)						
<i>MMP3</i>	rs679620	C/C	171 (37.2)	53 (32.3)						
		C/T	212 (46.1)	84 (51.2)	0,22	1.27 (0.87 - 1.85)	0,87	0.96 (0.59 - 1.56)	0,46	1.10 (0.85 - 1.42)
		T/T	77 (16.7)	27 (16.5)						
<i>MMP3</i>	rs522616	T/T	231 (50.2)	88 (53.7)						
		T/C	182 (39.6)	68 (41.5)	0,48	0.88 (0.61 - 1.26)	0,04*	0.45 (0.21 - 0.98)	0,15	0.81 (0.61 - 1.08)
		C/C	47 (10.2)	8 (4.9)						
<i>MMP9</i>	rs17576	A/A	221 (48)	71 (43.3)						
		A/G	197 (42.8)	73 (44.5)	0,3	1.21 (0.84 - 1.74)	0,24	1.41 (0.80 - 2.48)	0,19	1.20 (0.92 - 1.57)
		G/G	42 (9.1)	20 (12.2)						
<i>MMP9</i>	rs17577	G/G	340 (73.9)	130 (79.3)						
		G/A	111 (24.2)	34 (20.7)	0,19	0.75 (0.49 - 1.15)	0,99	-	0,1	0.71 (0.47 - 1.07)
		A/A	9 (2)	0 (0)						
<i>MMP13</i>	rs2252070	T/T	223 (48.5)	61 (37.2)						
		T/C	200 (43.5)	81 (49.4)	0,011*	1.61 (1.12 - 2.33)	0,043*	1.79 (1.02 - 3.15)	0,004*	1.49 (1.14 - 1.96)
		C/C	37 (8)	22 (13.4)						

OR: razão de odds; IC: intervalo de confiança.

^avalor de p ajustado por idade, sexo, ancestralidade genética, pressão alta, dislipidemia, diabetes e hipotireoidismo

*Diferença significativa entre grupos; p<0.05

[†]Os grupos tendiam a serem diferentes

Tabela 5B – Frequências de genótipos dos grupos casos (OC) e controles, ajustado por idade, sexo e ancestralidade.

Gene	SNP	Genótipo	Controles [n(%)]	Casos [n(%)]	Ajustado por idade, sexo e ancestralidade					
					Dominante		Recessivo		Aditivo	
					p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)
<i>COL1A1</i>	rs1800012	C/C	347 (75.4)	112 (68.3)						
		C/A	96 (20.9)	48 (29.3)	0,43	1.18 (0.78-1.79)	0,37	0.59 (0.19-1.87)	0,73	1.07 (0.75-1.51)
		A/A	17 (3.7)	4 (2.4)						
<i>COL5A1</i>	rs3196378	C/C	164 (35.7)	52 (31.7)						
		C/A	207 (45.1)	74 (45.1)	0,52	0.87 (0.57-1.33)	0,85	0.96 (0.61-1.51)	0,61	0.93 (0.72-1.21)
		A/A	88 (19.2)	38 (23.2)						
<i>COL5A1</i>	rs12722	C/C	154 (33.6)	51 (31.1)						
		C/T	203 (44.3)	74 (45.1)	0,33	0.81 (0.53-1.24)	0,61	0.89 (0.57-1.39)	0,67	0.89 (0.68-1.15)
		T/T	101 (22.1)	39 (23.8)						
<i>FNI</i>	rs6728999	C/C	427 (93.0)	164 (100)	0,99					
		C/T	32 (7)	0 (0)						
<i>TNC</i>	rs2104772	T/T	114 (24.9)	52 (31.7)						
		T/A	237 (51.7)	81 (49.4)	0,051	0.66 (0.43 - 1.00)	0,33	0.79 (0.49 - 1.26)	0,07	0.77 (0.58 - 1.01)
		A/A	107 (23.4)	31 (18.9)						
<i>TGFB1</i>	rs1800470	A/A	100 (24.5)	51 (31.1)						
		A/G	219 (53.7)	78 (47.6)	0,18	0.74 (0.48 - 1.15)	0,47	1.19 (0.74 - 1.94)	0,65	0.94 (0.70 - 1.25)
		G/G	89 (21.8)	35 (21.3)						
<i>TGFB1</i>	rs1800469	G/G	151 (34.8)	66 (40.2)						
		G/A	224 (51.6)	71 (43.3)	0,16	0.75 (0.51 - 1.12)	0,5	1.20 (0.71 - 2.03)	0,52	0.91 (0.69 - 1.21)
		A/A	59 (13.6)	27 (16.5)						
<i>TGFB1</i>	rs11568785	A/A	407 (88.9)	142 (86.6)						
		A/G	49 (10.7)	22 (13.4)	0,65	1.14 (0.65 - 2.01)	0,99		0,74	1.10 (0.63 - 1.91)
		G/G	2 (0.4)	0 (0)						
<i>TGFB1</i>	rs1590	T/T	220 (48.0)	89 (54.3)						
		T/G	207 (45.1)	61 (37.2)	0,26	0.80 (0.55 - 1.17)	0,3	1.46 (0.71 - 2.99)	0,62	0.93 (0.68 - 1.26)
		G/G	31 (6.8)	14 (8.5)						
<i>TIMP2</i>	rs2277698	C/C	339 (80.7)	127 (77.4)						
		C/T	79 (18.8)	36 (21.9)	0,11	1.48 (0.92 - 2.41)	0,39	2.98 (0.24 - 36.90)	0,09	1.49 (0.94 - 2.37)
		T/T	2 (0.5)	1 (0.6)						
<i>MMP2</i>	rs243865	C/C	340 (73.9)	107 (65.2)						
		C/T	108 (23.5)	51 (31.1)	0,33	1.23 (0.81 - 1.84)	0,92	1.06 (0.37 - 3.02)	0,38	1.17 (0.82 - 1.66)
		T/T	12 (2.6)	6 (3.7)						
<i>MMP2</i>	rs2285053	C/C	326 (70.9)	120 (73.2)						
		C/T	126 (27.4)	41 (25)	0,37	0.82 (0.54 - 1.26)	0,92	0.93 (0.23 - 3.76)	0,4	0.85 (0.58 - 1.24)
		T/T	8 (1.7)	3 (1.8)						
<i>MMP2</i>	rs243866	G/G	340 (73.9)	108 (65.9)						
		G/A	108 (23.5)	50 (30.5)	0,41	1.19 (0.79 - 1.79)	0,92	1.06 (0.37 - 3.02)	0,46	1.14 (0.80 - 1.62)
		A/A	12 (2.6)	6 (3.7)						
<i>MMP3</i>	rs679620	C/C	171 (37.2)	53 (32.3)						
		C/T	212 (46.1)	84 (51.2)	0,59	1.12 (0.75 - 1.67)	0,62	0.88 (0.53 - 1.47)	0,92	1.01 (0.77 - 1.33)
		T/T	77 (16.7)	27 (16.5)						
<i>MMP3</i>	rs522616	T/T	231 (50.2)	88 (53.7)						
		T/C	182 (39.6)	68 (41.5)	0,53	0.88 (0.60 - 1.30)	0,09	0.50 (0.23 - 1.12)	0,22	0.83 (0.61 - 1.12)
		C/C	47 (10.2)	8 (4.9)						
<i>MMP9</i>	rs17576	A/A	221 (48)	71 (43.3)						
		A/G	197 (42.8)	73 (44.5)	0,27	1.24 (0.85 - 1.81)	0,5	1.23 (0.68 - 2.25)	0,26	1.18 (0.89 - 1.56)
		G/G	42 (9.1)	20 (12.2)						
<i>MMP9</i>	rs17577	G/G	340 (73.9)	130 (79.3)						
		G/A	111 (24.2)	34 (20.7)	0,3	0.79 (0.50 - 1.24)	0,99		0,21	0.76 (0.49 - 1.17)
		A/A	9 (2)	0 (0)						
<i>MMP13</i>	rs2252070	T/T	223 (48.5)	61 (37.2)						
		T/C	200 (43.5)	81 (49.4)	0,01*	1.67 (1.13 - 2.47)	0,054	1.81 (0.99 - 3.33)	0,004*	1.53 (1.14 - 2.05)
		C/C	37 (8)	22 (13.4)						
<i>MMP13</i>	rs2252070	T/T	223 (48.5)	61 (37.2)						
		T/C	200 (43.5)	81 (49.4)	0,01*	1.67 (1.13 - 2.47)	0,054	1.81 (0.99 - 3.33)	0,004*	1.53 (1.14 - 2.05)
		C/C	37 (8)	22 (13.4)						

OR: razão de odds; IC: intervalo de confiança.

[‡]valor de p ajustado por idade, sexo, ancestralidade genética, pressão alta, dislipidemia, diabetes e hipotireoidismo

*Diferença significativa entre grupos; p<0.05

[#]Os grupos tendiam a serem diferentes

Tabela 5C – Frequências de genótipos dos grupos casos (OC) e controles, ajustado por idade, sexo, ancestralidade e comorbidades.

Gene	SNP	Genótipo	Controles [n(%)]	Casos [n(%)]	Ajustado por idade, sexo, ancestralidade e comorbidades ^a					
					Dominante		Recessivo		Aditivo	
					p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)
<i>COL1A1</i>	rs1800012	C/C	347 (75.4)	112 (68.3)						
		C/A	96 (20.9)	48 (29.3)	0,35	1.24 (0.79 - 1.95)	0,28	0.44 (0.98 - 1.98)	0,64	0.66 (0.80 - 0.50)
		A/A	17 (3.7)	4 (2.4)						
<i>COL5A1</i>	rs3196378	C/C	164 (35.7)	52 (31.7)						
		C/A	207 (45.1)	74 (45.1)	0,76	0.93 (0.59 - 1.47)	0,91	1.03 (0.63 - 1.68)	0,9	0.98 (0.73 - 1.31)
		A/A	88 (19.2)	38 (23.2)						
<i>COL5A1</i>	rs12722	C/C	154 (33.6)	51 (31.1)						
		C/T	203 (44.3)	74 (45.1)	0,57	0.87 (0.55 - 1.39)	0,79	0.94 (0.58 - 1.52)	0,61	0.93 (0.69 - 1.24)
		T/T	101 (22.1)	39 (23.8)						
<i>FNI</i>	rs6728999	C/C	427 (93.0)	164 (100)						
		C/T	32 (7)	0 (0)	0,99	-		-		-
<i>TNC</i>	rs2104772	T/T	114 (24.9)	52 (31.7)						
		T/A	237 (51.7)	81 (49.4)	0,12	0.69 (0.43 - 1.10)	0,56	0.86 (0.51 - 1.44)	0,18	0.81 (0.60 - 1.10)
		A/A	107 (23.4)	31 (18.9)						
<i>TGFB1</i>	rs1800470	A/A	100 (24.5)	51 (31.1)						
		A/G	219 (53.7)	78 (47.6)	0,23	0.75 (0.47 - 1.20)	0,61	1.15 (0.67 - 1.98)	0,62	0.92 (0.67 - 1.27)
		G/G	89 (21.8)	35 (21.3)						
<i>TGFB1</i>	rs1800469	G/G	151 (34.8)	66 (40.2)						
		G/A	224 (51.6)	71 (43.3)	0,31	0.80 (0.52 - 1.23)	0,4	1.28 (0.72 - 2.29)	0,78	0.96 (0.70 - 1.30)
		A/A	59 (13.6)	27 (16.5)						
<i>TGFBRI</i>	rs11568785	A/A	407 (88.9)	142 (86.6)						
		A/G	49 (10.7)	22 (13.4)	0,43	1.28 (0.69 - 2.37)	0,99	-	0,48	1.24 (0.68 - 2.26)
		G/G	2 (0.4)	0 (0)						
<i>TGFBRI</i>	rs1590	T/T	220 (48.0)	89 (54.3)						
		T/G	207 (45.1)	61 (37.2)	0,21	0.76 (0.50 - 1.16)	0,23	1.60 (0.74 - 3.47)	0,6	0.91 (0.65 - 1.28)
		G/G	31 (6.8)	14 (8.5)						
<i>TIMP2</i>	rs2277698	C/C	339 (80.7)	127 (77.4)						
		C/T	79 (18.8)	36 (21.9)	0,45	1.23 (0.72 - 2.08)	0,4	3.5 (0.19 - 65.77)	0,39	1.25 (0.75 - 2.08)
		T/T	2 (0.5)	1 (0.6)						
<i>MMP2</i>	rs243865	C/C	340 (73.9)	107 (65.2)						
		C/T	108 (23.5)	51 (31.1)	0,64	1.11 (0.71 - 1.74)	0,75	0.83 (0.27 - 2.59)	0,77	1.06 (0.72 - 1.55)
		T/T	12 (2.6)	6 (3.7)						
<i>MMP2</i>	rs2285053	C/C	326 (70.9)	120 (73.2)						
		C/T	126 (27.4)	41 (25)	0,39	0.82 (0.52 - 1.29)	0,84	1.16 (0.27 - 4.84)	0,48	0.86 (0.57 - 1.30)
		T/T	8 (1.7)	3 (1.8)						
<i>MMP2</i>	rs243866	G/G	340 (73.9)	108 (65.9)						
		G/A	108 (23.5)	50 (30.5)	0,73	1.08 (0.69 - 1.69)	0,75	0.83 (0.29 - 2.59)	0,85	1.04 (0.71 - 1.52)
		A/A	12 (2.6)	6 (3.7)						
<i>MMP3</i>	rs679620	C/C	171 (37.2)	53 (32.3)						
		C/T	212 (46.1)	84 (51.2)	0,79	1.06 (0.68 - 1.66)	0,38	0.78 (0.44 - 1.36)	0,76	0.96 (0.71 - 1.29)
		T/T	77 (16.7)	27 (16.5)						
<i>MMP3</i>	rs522616	T/T	231 (50.2)	88 (53.7)						
		T/C	182 (39.6)	68 (41.5)	0,89	1.03 (0.67 - 1.58)	0,09	0.46 (0.19 - 1.13)	0,52	0.89 (0.64 - 1.26)
		C/C	47 (10.2)	8 (4.9)						
<i>MMP9</i>	rs17576	A/A	221 (48)	71 (43.3)						
		A/G	197 (42.8)	73 (44.5)	0,1	1.43 (0.94 - 2.18)	0,68	1.14 (0.59 - 2.20)	0,16	1.25 (0.92 - 1.71)
		G/G	42 (9.1)	20 (12.2)						
<i>MMP9</i>	rs17577	G/G	340 (73.9)	130 (79.3)						
		G/A	111 (24.2)	34 (20.7)	0,28	0.76 (0.46 - 1.25)	0,99	-	0,21	0.74 (0.46 - 1.19)
		A/A	9 (2)	0 (0)						
<i>MMP13</i>	rs2252070	T/T	223 (48.5)	61 (37.2)						
		T/C	200 (43.5)	81 (49.4)	0.005*	1.85 (1.20 - 2.83)	0.05*	1.92 (1.00 - 3.67)	0.002*	1.64 (1.20 - 2.26)
		C/C	37 (8)	22 (13.4)						

OR: razão de odds; IC: intervalo de confiança.

^avalor de p ajustado por idade, sexo, ancestralidade genética, pressão alta, dislipidemia, diabetes e hipotireoidismo

*Diferença significativa entre grupos; p<0.05

[#]Os grupos tendiam a serem diferentes

Tabela 6. Fatores preditivos para susceptibilidade ao OC após regressão logística multivariada.

Variáveis	Total de indivíduos		Feminino		Masculino	
	Valor p	OR (95% IC)	Valor p	OR (95% IC)	Valor p	OR (95% IC)
Idade	0.188	0.98 (0.97 - 1.01)	0.355	0.99 (0.96 - 1.01)	0.001*	0.94 (0.91 - 0.97)
Sexo (Referência: Masculino)	0.112	1.36 (0.93 - 1.98)	-	-	-	-
<i>MMP13</i> rs2252070 (Referência: TT; modelo aditivo)	<0.001*	1.68 (1.27 - 2.21)	0.001*	1.84 (1.27 - 2.63)	-	-
<i>MMP9</i> rs17576 (Referência: AA; modelo aditivo)			0.05#	1.47 (1.00 - 2.16)	-	-
<i>TGFBI</i> rs1800470 (Referência: AA; modelo dominante)	-	-			0.008*	0.41 (0.21 - 0.79)
<i>TGFBRI</i> rs1590 (Referência: TT; modelo recessivo)	-	-	-	-	0.010*	3.08 (1.31 - 7.23)
Hipertensão arterial (Referência: ausente)	<0.001*	0.31 (0.19 - 0.50)	<0.001*	0.18 (0.09 - 0.38)	-	-
Dislipidemia (Referência: ausente)	<0.001*	7.04 (4.13 - 11.98)	<0.001*	8.03 (3.57 - 18.02)	<0.001*	8.19 (3.84 - 17.51)
Diabete (Referência: ausente)	-	-	0.045*	0.40 (0.16 - 0.98)	-	-
Tireoidopatia (Referência: ausente)	<0.001*	4.08 (2.38 - 6.99)	<0.001*	6.03 (3.09 - 11.77)	-	-

OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *Fator Preditivo para suscetibilidade a OC (p<0.05).

#Tendência para ser um fator preditivo (p=0.05).

Tabela 7A – Frequência de genótipos nos indivíduos femininos dos grupos casos (OC) e controles, ajustados por idade e sexo.

Gene	SNP	Genótipo	Controles [n(%)]	Casos [n(%)]	Ajustado por idade e sexo					
					Dominante		Recessivo		Aditivo	
					p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)
<i>COL1A1</i>	rs1800012	C/C	209 (79.5)	67 (69.1)						
		C/A	44 (16.7)	27 (27.8)	0,08	1.62 (0.95 - 2.75)	0,8	0.84 (0.22 - 3.15)	0,17	1.35 (0.89 - 2.08)
		A/A	10 (3.8)	3 (3.1)						
<i>COL5A1</i>	rs3196378	C/C	88 (33.5)	29 (29.9)						
		C/A	119 (45.2)	47 (48.5)	0,66	1.12 (0.67 - 1.87)	0,98	0.99 (0.56 - 1.75)	0,79	1.05 (0.76 - 1.45)
		A/A	56 (21.3)	21 (21.6)						
<i>COL5A1</i>	rs12722	C/C	85 (32.4)	28 (28.9)						
		C/T	114 (43.5)	48 (49.5)	0,68	1.11 (0.66 - 1.86)	0,62	0.87 (0.49 - 1.52)	0,97	0.99 (0.72 - 1.37)
		T/T	63 (24.1)	21 (21.6)						
<i>FN1</i>	rs6728999	C/C	244 (92.8)	97 (100)						
		C/T	19 (7.2)	0 (0)	0,98					
<i>TNC</i>	rs2104772	T/T	63 (24.1)	31 (32)						
		T/A	133 (50.8)	48 (49.5)	0,15	0.68 (0.41 - 1.14)	0,17	0.66 (0.37 - 1.19)	0,08	0.74 (0.53 - 1.04)
		A/A	66 (25.2)	18 (18.6)						
<i>TGFB1</i>	rs1800470	A/A	60 (23.8)	27 (27.8)						
		A/G	133 (52.8)	50 (51.5)	0,43	0.80 (0.47 - 1.38)	0,69	0.89 (0.50 - 1.58)	0,46	0.88 (0.62 - 1.24)
<i>TGFB1</i>	rs1800469	G/G	59 (23.4)	20 (20.6)						
		G/A	83 (32.7)	37 (38.1)	0,26	0.76 (0.46 - 1.23)	0,99	0.99 (0.51 - 1.95)	0,43	0.87 (0.61 - 1.23)
<i>TGFB1</i>	rs11568785	A/A	134 (52.8)	46 (47.4)						
		A/G	37 (14.6)	14 (14.4)						
		G/G	235 (89.3)	85 (87.6)	0,66	1.18 (0.57 - 2.43)	0,99	-	0,84	1.07 (0.54 - 2.12)
<i>TGFB1</i>	rs1590	T/T	26 (9.9)	12 (12.4)						
		T/G	2 (0.8)	0 (0)						
		G/G	127 (48.5)	52 (53.6)	0,42	0.82 (0.51 - 1.32)	0,89	0.94 (0.38 - 2.31)	0,48	0.87 (0.60 - 1.27)
<i>TIMP2</i>	rs2277698	T/G	114 (43.5)	38 (39.2)						
		G/G	21 (8)	7 (7.2)						
		C/C	209 (82)	79 (81.4)	0,91	1.04 (0.56 - 1.91)	0,5	2.62 (1.60 - 43.17)	0,81	1.07 (0.60 - 1.91)
<i>MMP2</i>	rs243865	C/T	45 (17.6)	17 (17.5)						
		T/T	1 (0.4)	1 (1)						
		C/C	188 (71.5)	63 (65)	0,28	1.32 (0.80 - 2.17)	0,67	1.31 (0.39 - 4.37)	0,29	1.26 (0.83 - 1.91)
<i>MMP2</i>	rs2285053	C/T	66 (25.1)	30 (30.9)						
		T/T	9 (3.4)	4 (4.1)						
		C/C	185 (70.3)	71 (73.2)	0,58	0.86 (0.511 - 1.46)	0,99	-	0,44	0.82 (0.50 - 1.36)
<i>MMP2</i>	rs243866	C/T	74 (28.1)	26 (26.8)						
		T/T	4 (1.5)	0 (0)						
		G/G	188 (71.5)	64 (66)	0,38	1.25 (0.76 - 2.01)	0,67	1.31 (0.39 - 4.37)	0,37	1.21 (0.80 - 1.85)
<i>MMP3</i>	rs679620	G/A	66 (25.1)	29 (29.9)						
		A/A	9 (3.4)	4 (4.1)						
		C/C	102 (38.8)	34 (35)	0,45	1.21 (0.74 - 1.97)	0,77	0.95 (0.47 - 1.76)	0,71	1.07 (0.76 - 1.49)
<i>MMP3</i>	rs522616	C/T	121 (46)	49 (50.5)						
		T/T	40 (15.2)	14 (14.4)						
		T/T	134 (51)	57 (58.8)	0,21	0.74 (0.46 - 1.19)	0,12	0.46 (0.17 - 1.23)	0,1	0.73 (0.50 - 1.06)
<i>MMP9</i>	rs17576	T/C	102 (38.8)	35 (36.1)						
		C/C	27 (10.3)	5 (5.2)						
		A/A	129 (49)	41 (42.3)	0,26	1.32 (0.82 - 2.11)	0,05 [#]	2.14 (0.99 - 0.458)	0,08	1.38 (0.96 - 1.98)
<i>MMP9</i>	rs17577	A/G	116 (44.1)	43 (44.3)						
		G/G	18 (6.8)	13 (13.4)						
		G/G	198 (75.3)	75 (77.3)	0,67	0.89 (0.51 - 1.54)	0,99	-	0,54	0.85 (0.50 - 1.44)
<i>MMP13</i>	rs2252070	G/A	62 (23.6)	22 (22.7)						
		A/A	3 (1.1)	0 (0)						
		T/T	125 (47.5)	35 (36.1)	0,041*	1.66 (1.02 - 2.69)	0,013*	2.39 (1.21 - 4.75)	0,007*	1.63 (1.14 - 2.31)
		T/C	115 (43.7)	45 (46.4)						
		C/C	23 (8.8)	17 (17.5)						

OR: razão de odds ratio; IC: intervalo de confiança.

[#]valor de p ajustado por idade, sexo, ancestralidade genética, pressão alta, dislipidemia, diabetes e hipotireoidismo

*Diferença significativa entre grupos; p<0.05

[#]Os grupos tendiam a serem diferentes

Tabela 7B – Frequência de genótipos nos indivíduos femininos dos grupos casos (OC) e controles, ajustados por idade, sexo e ancestralidade.

Gene	SNP	Genótipo	Controles [n(%)]	Casos [n(%)]	Ajustado por idade, sexo e ancestralidade					
					Dominante		Recessivo		Aditivo	
					p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)
COL1A1	rs1800012	C/C	209 (79.5)	67 (69.1)	0,48	1.23 (0.69 - 2.20)	0,74	0.79 (0.20 - 3.16)	0,64	1.19 (0.69 - 1.79)
		C/A	44 (16.7)	27 (27.8)						
		A/A	10 (3.8)	3 (3.1)						
COL5A1	rs3196378	C/C	88 (33.5)	29 (29.9)	0,46	0.80 (0.45 - 1.43)	0,39	0.77 (0.42 - 1.41)	0,33	0.84 (0.58 - 1.20)
		C/A	119 (45.2)	47 (48.5)						
		A/A	56 (21.3)	21 (21.6)						
COL5A1	rs12722	C/C	85 (32.4)	28 (28.9)	0,48	0.811 (0.45 - 1.46)	0,17	0.66 (0.36 - 1.20)	0,21	0.79 (0.55 - 1.14)
		C/T	114 (43.5)	48 (49.5)						
		T/T	63 (24.1)	21 (21.6)						
FNI	rs6728999	C/C	244 (92.8)	97 (100)	0,98					
		C/T	19 (7.2)	0 (0)						
TNC	rs2104772	T/T	63 (24.1)	31 (32)	0,29	0.74 (0.42 - 1.29)	0,35	0.74 (0.40 - 1.39)	0,22	0.79 (0.55 - 1.14)
		T/A	133 (50.8)	48 (49.5)						
		A/A	66 (25.2)	18 (18.6)						
TGFB1	rs1800470	A/A	60 (23.8)	27 (27.8)	0,68	0.88 (0.50 - 1.58)	0,86	0.96 (0.51 - 1.79)	0,73	0.94 (0.65 - 1.36)
		A/G	133 (52.8)	50 (51.5)						
		G/G	59 (23.4)	20 (20.6)						
TGFB1	rs1800469	G/G	83 (32.7)	37 (38.1)	0,38	0.79 (0.47 - 1.34)	0,76	0.89 (0.44 - 1.83)	0,44	0.86 (0.59 - 1.26)
		G/A	134 (52.8)	46 (47.4)						
		A/A	37 (14.6)	14 (14.4)						
TGFBRI	rs11568785	A/A	235 (89.3)	85 (87.6)	0,98	1.01 (0.47 - 2.18)	0,99	-	0,91	0.96 (0.46 - 2.00)
		A/G	26 (9.9)	12 (12.4)						
		G/G	2 (0.8)	0 (0)						
TGFBRI	rs1590	T/T	127 (48.5)	52 (53.6)	0,71	0.91 (0.55 - 1.50)	0,91	0.95 (0.36 - 2.47)	0,73	0.93 (0.62 - 1.39)
		T/G	114 (43.5)	38 (39.2)						
		G/G	21 (8)	7 (7.2)						
TIMP2	rs2277698	C/C	209 (82)	79 (81.4)	0,82	1.08 (0.56 - 2.09)	0,3	4.96 (0.29 - 84.80)	0,67	1.15 (0.61 - 2.15)
		C/T	45 (17.6)	17 (17.5)						
		T/T	1 (0.4)	1 (1)						
MMP2	rs243865	C/C	188 (71.5)	63 (65)	0,94	0.98 (0.57 - 1.68)	0,99	1.01 (0.28 - 3.66)	0,95	0.99 (0.63 - 1.55)
		C/T	66 (25.1)	30 (30.9)						
		T/T	9 (3.4)	4 (4.1)						
MMP2	rs2285053	C/C	185 (70.3)	71 (73.2)	0,33	0.76 (0.43 - 1.33)	0,99	-	0,2	0.71 (0.42 - 1.20)
		C/T	74 (28.1)	26 (26.8)						
		T/T	4 (1.5)	0 (0)						
MMP2	rs243866	G/G	188 (71.5)	64 (66)	0,78	0.93 (0.54 - 1.59)	0,99	1.01 (0.28 - 3.66)	0,82	0.95 (0.60 - 1.50)
		G/A	66 (25.1)	29 (29.9)						
		A/A	9 (3.4)	4 (4.1)						
MMP3	rs679620	C/C	102 (38.8)	34 (35)	0,52	1.19 (0.71 - 2.00)	0,61	0.83 (0.41 - 1.69)	0,85	1.04 (0.72 - 1.49)
		C/T	121 (46)	49 (50.5)						
		T/T	40 (15.2)	14 (14.4)						
MMP3	rs522616	T/T	134 (51)	57 (58.8)	0,36	0.79 (0.47 - 1.32)	0,18	0.49 (0.18 - 1.38)	0,19	0.76 (0.51 - 1.15)
		T/C	102 (38.8)	35 (36.1)						
		C/C	27 (10.3)	5 (5.2)						
MMP9	rs17576	A/A	129 (49)	41 (42.3)	0,21	1.38 (0.83 - 2.29)	0,27	1.57 (0.70 - 3.54)	0,15	1.32 (0.90 - 1.93)
		A/G	116 (44.1)	43 (44.3)						
		G/G	18 (6.8)	13 (13.4)						
MMP9	rs17577	G/G	198 (75.3)	75 (77.3)	0,83	0.94 (0.52 - 1.70)	0,99	-	0,66	0.88 (0.50 - 1.56)
		G/A	62 (23.6)	22 (22.7)						
		A/A	3 (1.1)	0 (0)						
MMP13	rs2252070	T/T	125 (47.5)	35 (36.1)	0,058	1.66 (0.98 - 2.79)	0,013*	2.67 (1.23 - 5.80)	0,009*	1.67 (1.14 - 2.46)
		T/C	115 (43.7)	45 (46.4)						
		C/C	23 (8.8)	17 (17.5)						

OR: razão de odds ratio; IC: intervalo de confiança.

^avalor de p ajustado por idade, sexo, ancestralidade genética, pressão alta, dislipidemia, diabetes e hipotireoidismo

*Diferença significativa entre grupos; p<0.05

[#]Os grupos tendiam a serem diferentes

Tabela 7C – Frequência de genótipos nos indivíduos femininos dos grupos casos (OC) e controles, ajustados por idade, sexo, ancestralidade e comorbidades.

Gene	SNP	Genótipo	Controles [n(%)]	Casos [n(%)]	Ajustado por idade, sexo, ancestralidade e comorbidades ³						
					Dominante		Recessivo		Aditivo		
					OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	
COL1A1	rs1800012	C/C	209 (79.5)	67 (69.1)							
		C/A	44 (16.7)	27 (27.8)	1.19 (0.69 - 1.79)	0,61	1.18 (0.62 - 2.26)	0,77	0.77 (0.13 - 4.42)	0,74	1.10 (0.64 - 1.89)
		A/A	10 (3.8)	3 (3.1)							
COL5A1	rs3196378	C/C	88 (33.5)	29 (29.9)							
		C/A	119 (45.2)	47 (48.5)	0.84 (0.58 - 1.20)	0,63	0.85 (0.43 - 1.67)	0,52	0.80 (0.41 - 1.57)	0,49	0.29 (0.93 - 0.89)
		A/A	56 (21.3)	21 (21.6)							
COL5A1	rs12722	C/C	85 (32.4)	28 (28.9)							
		C/T	114 (43.5)	48 (49.5)	0.79 (0.55 - 1.14)	0,64	0.85 (0.42 - 1.69)	0,23	0.66 (0.34 - 1.29)	0,29	0.80 (0.53 - 1.21)
		T/T	63 (24.1)	21 (21.6)							
FNI	rs6728999	C/C	244 (92.8)	97 (100)							
		C/T	19 (7.2)	0 (0)		0,98					
TNC	rs2104772	T/T	63 (24.1)	31 (32)							
		T/A	133 (50.8)	48 (49.5)	0.79 (0.55 - 1.14)	0,49	0.80 (0.42 - 1.52)	0,61	0.83 (0.40 - 1.73)	0,46	0.85 (0.56 - 1.30)
		A/A	66 (25.2)	18 (18.6)							
TGFB1	rs1800470	A/A	60 (23.8)	27 (27.8)							
		A/G	133 (52.8)	50 (51.5)	0.94 (0.65 - 1.36)	0,86	1.06 (0.54 - 2.07)	0,71	0.88 (0.42 - 1.84)	0,93	0.98 (0.64 - 1.51)
		G/G	59 (23.4)	20 (20.6)							
TGFB1	rs1800469	G/G	83 (32.7)	37 (38.1)							
		G/A	134 (52.8)	46 (47.4)	0.86 (0.59 - 1.26)	0,86	0.95 (0.51 - 1.74)	0,67	0.83 (0.36 - 1.94)	0,73	0.93 (0.60 - 1.43)
		A/A	37 (14.6)	14 (14.4)							
TGFBRI	rs11568785	A/A	235 (89.3)	85 (87.6)							
		A/G	26 (9.9)	12 (12.4)	0.96 (0.46 - 2.00)	0,61	1.26 (0.52 - 3.05)	0,99	-	0,66	1.21 (0.52 - 2.83)
		G/G	2 (0.8)	0 (0)							
TGFBRI	rs1590	T/T	127 (48.5)	52 (53.6)							
		T/G	114 (43.5)	38 (39.2)	0.93 (0.62 - 1.39)	0,23	0.70 (0.39 - 1.25)	0,75	0.84 (0.29 - 2.41)	0,28	0.77 (0.49 - 1.23)
		G/G	21 (8)	7 (7.2)							
TIMP2	rs2277698	C/C	209 (82)	79 (81.4)							
		C/T	45 (17.6)	17 (17.5)	1.15 (0.61 - 2.15)	0,78	0.90 (0.43 - 1.89)	0,27	12.72 (0.13 - 1246.59)	0,95	0.98 (0.48 - 1.98)
		T/T	1 (0.4)	1 (1)							
MMP2	rs243865	C/C	188 (71.5)	63 (65)							
		C/T	66 (25.1)	30 (30.9)	0.99 (0.63 - 1.55)	0,5	0.81 (0.44 - 1.49)	0,78	0.81 (0.19 - 3.49)	0,53	0.84 (0.50 - 1.41)
		T/T	9 (3.4)	4 (4.1)							
MMP2	rs2285053	C/C	185 (70.3)	71 (73.2)							
		C/T	74 (28.1)	26 (26.8)	0.71 (0.42 - 1.20)	0,37	0.75 (0.39 - 1.41)	0,99	-	0,28	0.71 (0.39 - 1.31)
		T/T	4 (1.5)	0 (0)							
MMP2	rs243866	G/G	188 (71.5)	64 (66)							
		G/A	66 (25.1)	29 (29.9)	0.95 (0.60 - 1.50)	0,41	0.77 (0.42 - 1.42)	0,78	0.81 (0.19 - 3.48)	0,43	0.81 (0.48 - 1.36)
		A/A	9 (3.4)	4 (4.1)							
MMP3	rs679620	C/C	102 (38.8)	34 (35)							
		C/T	121 (46)	49 (50.5)	1.04 (0.72 - 1.49)	0,88	0.96 (0.52 - 1.75)	0,29	0.64 (0.29 - 1.45)	0,5	0.87 (0.57 - 1.32)
		T/T	40 (15.2)	14 (14.4)							
MMP3	rs522616	T/T	134 (51)	57 (58.8)							
		T/C	102 (38.8)	35 (36.1)	0.76 (0.51 - 1.15)	0,72	0.89 (0.49 - 1.64)	0,31	0.54 (0.16 - 1.77)	0,47	0.84 (0.52 - 1.35)
		C/C	27 (10.3)	5 (5.2)							
MMP9	rs17576	A/A	129 (49)	41 (42.3)							
		A/G	116 (44.1)	43 (44.3)	1.32 (0.90 - 1.93)	0,07	1.73 (0.96 - 3.13)	0,29	1.65 (0.65 - 4.14)	0,05 [#]	1.51 (0.97 - 2.33)
		G/G	18 (6.8)	13 (13.4)							
MMP9	rs17577	G/G	198 (75.3)	75 (77.3)							
		G/A	62 (23.6)	22 (22.7)	0.88 (0.50 - 1.56)	0,71	0.88 (0.44 - 1.75)	0,99	-	0,62	0.85 (0.44 - 1.64)
		A/A	3 (1.1)	0 (0)							
MMP13	rs2252070	T/T	125 (47.5)	35 (36.1)							
		T/C	115 (43.7)	45 (46.4)	1.67 (1.14 - 2.46)	0.036*	1.92 (1.04 - 3.53)	0.008*	3.27 (1.36 - 7.86)	0.005*	1.91 (1.22 - 2.99)
		C/C	23 (8.8)	17 (17.5)							

OR: razão de odds ratio; IC: intervalo de confiança.

³valor de p ajustado por idade, sexo, ancestralidade genética, pressão alta, dislipidemia, diabetes e hipotireoidismo

*Diferença significativa entre grupos; p<0.05

[#]Os grupos tendiam a serem diferentes

Tabela 8A – Frequência de genótipos nos indivíduos masculinos dos grupos casos (OC) e controles, ajustados por idade e sexo.

Gene	SNP	Genótipo	Controles [n(%)]	Casos [n(%)]	Ajustado por idade e sexo					
					Dominante		Recessivo		Aditivo	
					p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)
<i>COL1A1</i>	rs1800012	C/C	138 (70.1)	45 (67.2)	0,65	1.15 (0.63 - 2.08)	0,4	0.41 (0.05 - 3.36)	0,91	1.03 (0.61 - 1.73)
		C/A	52 (26.4)	21 (31.3)						
		A/A	7 (3.6)	1 (1.5)						
<i>COL5A1</i>	rs3196378	C/C	76 (38.8)	23 (34.3)	0,5	1.22 (0.68 - 2.18)	0,11	1.74 (0.89 - 3.39)	0,19	1.29 (0.88 - 1.89)
		C/A	88 (44.9)	27 (40.3)						
		A/A	32 (16.3)	17 (25.4)						
<i>COL5A1</i>	rs12722	C/C	69 (35.2)	23 (34.3)	0,91	1.03 (0.58 - 1.85)	0,21	1.52 (0.79 - 2.89)	0,44	1.16 (0.80 - 1.69)
		C/T	89 (45.4)	26 (38.8)						
		T/T	38 (19.4)	18 (26.9)						
<i>FN1</i>	rs6728999	C/C	183 (93.4)	67 (100)	0,99					
		C/T	13 (6.6)	0 (0)						
<i>TNC</i>	rs2104772	T/T	51 (26)	21 (31.3)	0,4	0.77 (0.42 - 1.41)	0,79	0.91 (0.45 - 1.83)	0,48	0.87 (0.58 - 1.29)
		T/A	104 (53.1)	33 (49.3)						
		A/A	41 (20.9)	13 (19.4)						
<i>TGFB1</i>	rs1800470	A/A	40 (25.6)	24 (35.8)	0,07	0.55 (0.29 - 1.05)	0,74	1.13 (0.55 - 2.33)	0,32	0.80 (0.52 - 1.23)
		A/G	86 (55.1)	28 (41.8)						
		G/G	30 (19.2)	15 (22.4)						
<i>TGFB1</i>	rs1800469	G/G	68 (37.8)	29 (43.3)	0,38	0.77 (0.43 - 1.37)	0,18	1.70 (0.79 - 3.61)	0,94	1.02 (0.67 - 1.53)
		G/A	90 (50)	25 (37.3)						
		A/A	22 (12.2)	13 (19.4)						
<i>TGFBRI</i>	rs11568785	A/A	171 (88.2)	57 (85.1)	0,53	1.29 (0.58 - 2.89)				
		A/G	23 (11.8)	10 (14.9)						
		G/G	-	-						
<i>TGFBRI</i>	rs1590	T/T	93 (47.4)	37 (55.2)	0,26	0.72 (0.41 - 1.27)	0,13	2.19 (0.80 - 6.01)	0,76	0.93 (0.59 - 1.47)
		T/G	93 (47.4)	23 (34.3)						
		G/G	10 (5.2)	7 (10.4)						
<i>TIMP2</i>	rs2277698	C/C	130 (78.8)	48 (71.6)	0,14	1.65 (0.85 - 3.23)	1		0,19	1.55 (0.81 - 2.96)
		C/T	34 (20.6)	19 (28.4)						
		T/T	1 (0.6)	0 (0)						
<i>MMP2</i>	rs243865	C/C	152 (77.2)	44 (65.7)	0,07	1.76 (0.96 - 3.22)	0,45	2.00 (0.33 - 12.28)	0,07	1.65 (0.97 - 2.83)
		C/T	42 (21.3)	21 (31.3)						
		T/T	3 (1.5)	2 (3)						
<i>MMP2</i>	rs2285053	C/C	141 (71.6)	49 (73.1)	0,82	0.93 (0.50 - 1.73)	0,3	2.25 (0.49 - 10.36)	0,9	1.04 (0.61 - 1.77)
		C/T	52 (26.4)	15 (22.4)						
		T/T	4 (2)	3 (4.5)						
<i>MMP2</i>	rs243866	G/G	152 (77.2)	44 (65.7)	0,07	1.76 (0.96 - 3.22)	0,45	2.00 (0.33 - 12.28)	0,07	1.66 (0.97 - 2.83)
		G/A	41 (21.3)	21 (31.3)						
		A/A	3 (1.5)	2 (3)						
<i>MMP3</i>	rs679620	C/C	69 (35)	19 (28.4)	0,31	1.37 (0.75 - 2.51)	0,94	1.03 (0.51 - 2.08)	0,47	1.15 (0.78 - 1.70)
		C/T	91 (46.2)	35 (52.2)						
		T/T	37 (18.8)	13 (19.4)						
<i>MMP3</i>	rs522616	T/T	97 (49.2)	31 (46.3)	0,68	1.12 (0.65 - 1.96)	0,18	0.42 (0.12 - 1.47)	0,78	0.94 (0.61 - 1.45)
		T/C	80 (40.6)	33 (49.3)						
		C/C	20 (10.2)	3 (4.5)						
<i>MMP9</i>	rs17576	A/A	92 (46.7)	30 (44.8)	0,79	1.08 (0.62 - 1.88)	0,71	0.85 (0.35 - 2.06)	0,98	1.00 (0.67 - 1.51)
		A/G	81 (41.1)	30 (44.8)						
		G/G	24 (12.2)	7 (10.4)						
<i>MMP9</i>	rs17577	G/G	142 (72.1)	55 (82.1)	0,11	0.57 (0.28 - 1.15)	0,99		0,07	0.55 (0.29 - 1.06)
		G/A	49 (24.9)	12 (17.9)						
		A/A	6 (3)	0 (0)						
<i>MMP13</i>	rs2252070	T/T	98 (49.7)	26 (38.8)	0,12	1.57 (0.89 - 2.76)	0,95	1.04 (0.36 - 3.00)	0,2	1.34 (0.86 - 2.08)
		T/C	85 (43.1)	36 (53.7)						
		C/C	14 (7.1)	5 (7.5)						

OR: razão de odds; IC: intervalo de confiança.

[‡]valor de p ajustado por idade, gênero, ascendência genética, pressão alta, dislipidemia, diabetes e hipotireoidismo

*Diferença significativa entre grupos; p<0.05

Tabela 8B – Frequência de genótipos nos indivíduos masculinos dos grupos casos (OC) e controles, ajustados por idade, sexo e ancestralidade.

Gene	SNP	Genótipo	Controles [n(%)]	Casos [n(%)]	Ajustado por idade, sexo e ancestralidade						
					Dominante		Recessivo		Aditivo		
					p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	
COL1A1	rs1800012	C/C	138 (70.1)	45 (67.2)							
		C/A	52 (26.4)	21 (31.3)	0,82	1.08 (0.58 - 1.99)	0,35	0.36 (0.04 - 3.13)	0,91	0.97 (0.57 - 1.67)	
		A/A	7 (3.6)	1 (1.5)							
COL5A1	rs3196378	C/C	76 (38.8)	23 (34.3)							
		C/A	88 (44.9)	27 (40.3)	0,8	0.92 (0.50 - 1.71)	0,46	1.30 (0.65 - 2.59)	0,79	1.05 (0.71 - 1.57)	
		A/A	32 (16.3)	17 (25.4)							
COL5A1	rs12722	C/C	69 (35.2)	23 (34.3)							
		C/T	89 (45.4)	26 (38.8)	0,44	0.79 (0.42 - 1.46)	0,45	1.29 (0.67 - 2.52)	0,97	0.99 (0.67 - 1.47)	
		T/T	38 (19.4)	18 (26.9)							
FNI	rs6728999	C/C	183 (93.4)	67 (100)							
		C/T	13 (6.6)	0 (0)	0,99						
TNC	rs2104772	T/T	51 (26)	21 (31.3)							
		T/A	104 (53.1)	33 (49.3)	0,11	0.59 (0.31 - 1.13)	0,69	0.86 (0.42 - 1.77)	0,21	0.76 (0.49 - 1.17)	
		A/A	41 (20.9)	13 (19.4)							
TGFB1	rs1800470	A/A	40 (25.6)	24 (35.8)							
		A/G	86 (55.1)	28 (41.8)	0,11	0.59 (0.30 - 1.14)	0,26	1.57 (0.72 - 3.41)	0,67	0.91 (0.58 - 1.43)	
		G/G	30 (19.2)	15 (22.4)							
TGFB1	rs1800469	G/G	68 (37.8)	29 (43.3)							
		G/A	90 (50)	25 (37.3)	0,28	0.72 (0.39 - 1.30)	0,17	1.76 (0.79 - 3.89)	0,95	0.99 (0.64 - 1.51)	
		A/A	22 (12.2)	13 (19.4)							
TGFBRI	rs11568785	A/A	171 (88.2)	57 (85.1)							
		A/G	23 (11.8)	10 (14.9)	0,51	1.32 (0.57 - 3.05)					
		G/G	-	-							
TGFBRI	rs1590	T/T	93 (47.4)	37 (55.2)							
		T/G	93 (47.4)	23 (34.3)	0,22	0.69 (0.39 - 1.24)	0,08	2.70 (0.88 - 8.34)	0,73	0.92 (0.57 - 1.49)	
		G/G	10 (5.2)	7 (10.4)							
TIMP2	rs2277698	C/C	130 (78.8)	48 (71.6)							
		C/T	34 (20.6)	19 (28.4)	0,029*	2.25 (1.09 - 4.66)	1	-	0,035*	2.15 (1.06 - 4.36)	
		T/T	1 (0.6)	0 (0)							
MMP2	rs243865	C/C	152 (77.2)	44 (65.7)							
		C/T	42 (21.3)	21 (31.3)	0,12	1.66 (0.88 - 3.12)	0,82	1.24 (0.20 - 7.79)	0,15	1.51 (0.86 - 2.63)	
		T/T	3 (1.5)	2 (3)							
MMP2	rs2285053	C/C	141 (71.6)	49 (73.1)							
		C/T	52 (26.4)	15 (22.4)	0,75	0.90 (0.47 - 1.71)	0,25	2.52 (0.52 - 12.19)	0,93	1.02 (0.59 - 1.78)	
		T/T	4 (2)	3 (4.5)							
MMP2	rs243866	G/G	152 (77.2)	44 (65.7)							
		G/A	41 (21.3)	21 (31.3)	0,12	1.66 (0.88 - 3.11)	0,82	1.25 (0.20 - 7.79)	0,15	1.51 (0.86 - 2.62)	
		A/A	3 (1.5)	2 (3)							
MMP3	rs679620	C/C	69 (35)	19 (28.4)							
		C/T	91 (46.2)	35 (52.2)	0,86	1.06 (0.56 - 2.01)	0,93	0.97 (0.46 - 2.03)	0,95	1.01 (0.67 - 1.55)	
		T/T	37 (18.8)	13 (19.4)							
MMP3	rs522616	T/T	97 (49.2)	31 (46.3)							
		T/C	80 (40.6)	33 (49.3)	0,87	1.05 (0.58 - 1.89)	0,32	0.52 (0.14 - 1.87)	0,76	0.93 (0.58 - 1.59)	
		C/C	20 (10.2)	3 (4.5)							
MMP9	rs17576	A/A	92 (46.7)	30 (44.8)							
		A/G	81 (41.1)	30 (44.8)	0,81	1.07 (0.60 - 1.91)	0,8	0.88 (0.35 - 2.25)	0,96	1.01 (0.66 - 1.55)	
		G/G	24 (12.2)	7 (10.4)							
MMP9	rs17577	G/G	142 (72.1)	55 (82.1)							
		G/A	49 (24.9)	12 (17.9)	0,19	0.62 (0.30 - 1.30)	0,99	-	0,16	0.61 (0.30 - 1.22)	
		A/A	6 (3)	0 (0)							
MMP13	rs2252070	T/T	98 (49.7)	26 (38.8)							
		T/C	85 (43.1)	36 (53.7)	0,08	1.69 (0.94 - 3.04)	0,91	0.94 (0.32 - 2.77)	0,18	1.36 (0.87 - 2.14)	
		C/C	14 (7.1)	5 (7.5)							

OR: razão de odds; IC: intervalo de confiança.

³valor de p ajustado por idade, gênero, ascendência genética, pressão alta, dislipidemia, diabetes e hipotireoidismo

*Diferença significativa entre grupos: p<0.05

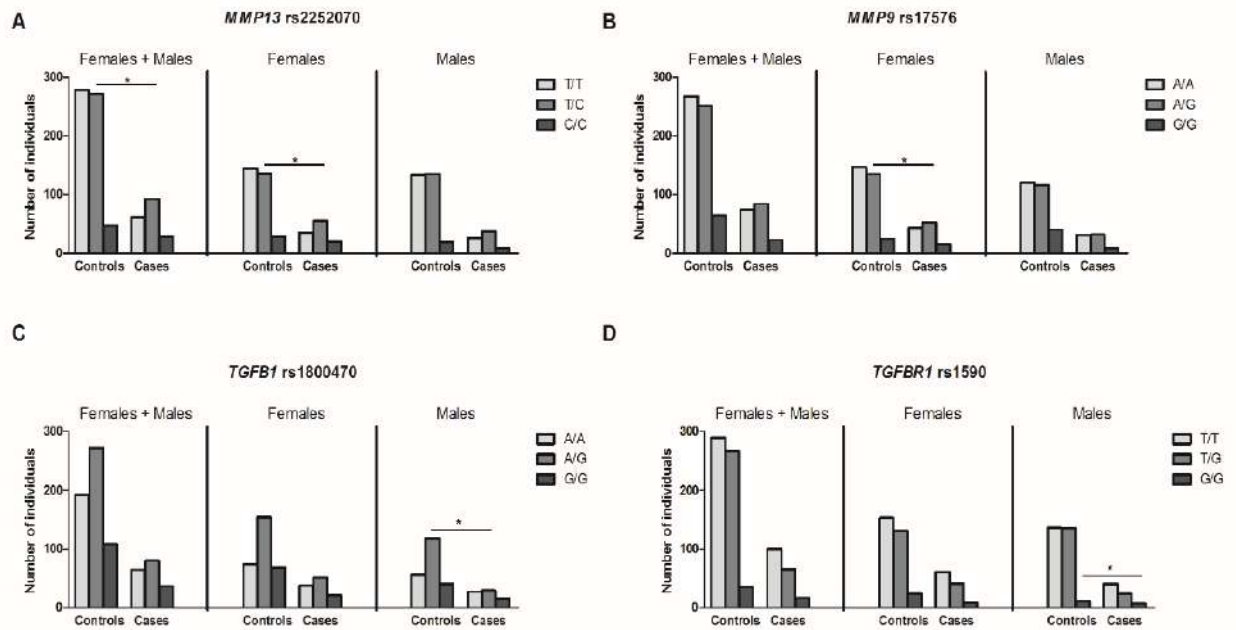
Tabela 8C – Frequência de genótipos nos indivíduos masculinos dos grupos casos (OC) e controles, ajustados por idade, sexo, ancestralidade e comorbidades.

Gene	SNP	Genótipo	Controles [n(%)]	Casos [n(%)]	Ajustado por idade, sexo, ancestralidade e comorbidades ³						
					Dominante		Recessivo		Aditivo		
					OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)	p-value	OR (95% IC)
COL1A1	rs1800012	C/C	138 (70.1)	45 (67.2)							
		C/A	52 (26.4)	21 (31.3)	0.97 (0.57 - 1.67)	0,46	1.29 (0.66 - 2.49)	0,21	0.20 (0.02 - 2.52)	0,79	1.08 (0.60 - 1.94)
		A/A	7 (3.6)	1 (1.5)							
COL5A1	rs3196378	C/C	76 (38.8)	23 (34.3)							
		C/A	88 (44.9)	27 (40.3)	1.05 (0.71 - 1.57)	0,82	0.93 (0.48 - 1.79)	0,55	1.26 (0.59 - 2.64)	0,85	1.04 (0.68 - 1.60)
		A/A	32 (16.3)	17 (25.4)							
COL5A1	rs12722	C/C	69 (35.2)	23 (34.3)							
		C/T	89 (45.4)	26 (38.8)	0.99 (0.67 - 1.47)	0,47	0.78 (0.40 - 1.53)	0,47	1.30 (0.64 - 2.64)	0,97	0.99 (0.65 - 1.52)
		T/T	38 (19.4)	18 (26.9)							
FNI	rs6728999	C/C	183 (93.4)	67 (100)							
		C/T	13 (6.6)	0 (0)		0,99					
TNC	rs2104772	T/T	51 (26)	21 (31.3)							
		T/A	104 (53.1)	33 (49.3)	0.76 (0.49 - 1.17)	0,15	0.60 (0.30 - 1.20)	0,76	0.89 (0.42 - 1.89)	0,27	0.77 (0.49 - 1.22)
		A/A	41 (20.9)	13 (19.4)							
TGFB1	rs1800470	A/A	40 (25.6)	24 (35.8)							
		A/G	86 (55.1)	28 (41.8)	0.91 (0.58 - 1.43)	0,04*	0.47 (0.23 - 0.96)	0,42	1.41 (0.61 - 3.29)	0,35	0.79 (0.48 - 1.29)
		G/G	30 (19.2)	15 (22.4)							
TGFB1	rs1800469	G/G	68 (37.8)	29 (43.3)							
		G/A	90 (50)	25 (37.3)	0.99 (0.64 - 1.51)	0,14	0.61 (0.32 - 1.17)	0,17	1.80 (0.77 - 4.21)	0,74	0.93 (0.58 - 1.47)
		A/A	22 (12.2)	13 (19.4)							
TGFBRI	rs11568785	A/A	171 (88.2)	57 (85.1)							
		A/G	23 (11.8)	10 (14.9)		0,35	1.53 (0.63 - 3.70)				
		G/G	-	-							
TGFBRI	rs1590	T/T	93 (47.4)	37 (55.2)							
		T/G	93 (47.4)	23 (34.3)	0.92 (0.57 - 1.49)	0,34	0.73 (0.39 - 1.38)	0,027*	4.11 (1.17 - 14.38)	0,95	1.02 (0.60 - 1.73)
		G/G	10 (5.2)	7 (10.4)							
TIMP2	rs2277698	C/C	130 (78.8)	48 (71.6)							
		C/T	34 (20.6)	19 (28.4)	2.15 (1.06 - 4.36)	0,08	1.99 (0.92 - 0.43)	1	-	0,09	1.93 (0.091 - 4.13)
		T/T	1 (0.6)	0 (0)							
MMP2	rs243865	C/C	152 (77.2)	44 (65.7)							
		C/T	42 (21.3)	21 (31.3)	1.51 (0.86 - 2.63)	0,24	1.50 (0.76 - 2.97)	0,87	0.85 (0.12 - 5.92)	0,33	1.34 (0.74 - 2.44)
		T/T	3 (1.5)	2 (3)							
MMP2	rs2285053	C/C	141 (71.6)	49 (73.1)							
		C/T	52 (26.4)	15 (22.4)	1.02 (0.59 - 1.78)	0,7	0.87 (0.44 - 1.74)	0,19	2.91 (0.59 - 14.28)	0,92	1.03 (0.57 - 1.86)
		T/T	4 (2)	3 (4.5)							
MMP2	rs243866	G/G	152 (77.2)	44 (65.7)							
		G/A	41 (21.3)	21 (31.3)	1.51 (0.86 - 2.62)	0,24	1.50 (0.76 - 2.98)	0,87	0.85 (0.12 - 5.92)	0,33	1.34 (0.74 - 2.44)
		A/A	3 (1.5)	2 (3)							
MMP3	rs679620	C/C	69 (35)	19 (28.4)							
		C/T	91 (46.2)	35 (52.2)	1.01 (0.67 - 1.55)	0,67	1.16 (0.58 - 2.32)	0,83	0.92 (0.41 - 2.03)	0,87	1.04 (0.66 - 1.63)
		T/T	37 (18.8)	13 (19.4)							
MMP3	rs522616	T/T	97 (49.2)	31 (46.3)							
		T/C	80 (40.6)	33 (49.3)	0.93 (0.58 - 1.59)	0,71	1.13 (0.60 - 2.14)	0,21	0.40 (0.10 - 1.65)	0,81	0.94 (0.57 - 1.55)
		C/C	20 (10.2)	3 (4.5)							
MMP9	rs17576	A/A	92 (46.7)	30 (44.8)							
		A/G	81 (41.1)	30 (44.8)	1.01 (0.66 - 1.55)	0,6	1.19 (0.64 - 2.23)	0,61	0.82 (0.39 - 1.73)	0,79	1.07 (0.67 - 1.69)
		G/G	24 (12.2)	7 (10.4)							
MMP9	rs17577	G/G	142 (72.1)	55 (82.1)							
		G/A	49 (24.9)	12 (17.9)	0.61 (0.30 - 1.22)	0,34	0.69 (0.32 - 1.48)	0,99	-	0,3	0.67 (0.32 - 1.43)
		A/A	6 (3)	0 (0)							
MMP13	rs2252070	T/T	98 (49.7)	26 (38.8)							
		T/C	85 (43.1)	36 (53.7)	1.36 (0.87 - 2.14)	0,09	1.73 (0.92 - 3.26)	0,58	0.71 (0.22 - 2.30)	0,27	1.31 (0.81 - 2.13)
		C/C	14 (7.1)	5 (7.5)							

OR: razão de odds; IC: intervalo de confiança.

³valor de p ajustado por idade, gênero, ascendência genética, pressão alta, dislipidemia, diabetes e hipotireoidismo

*Diferença significativa entre grupos; p<0.05



* Diferença significativa entre os grupos após ajuste por idade, sexo e comorbidades ($p < 0.05$).

Figura 3. Frequência dos genótipos dos indivíduos dos grupos casos (OC) e controles.

A) *MMP13* rs2252070; B) *MMP9* rs17576; C) *TGFB1* rs1800470; D) *TGFB1* rs1590.

Quando apenas mulheres foram avaliadas, a presença do alelo C de rs2252070 de *MMP13* também foi um fator de risco independente para ombro congelado ($p = 0,005$, OR=1.91, 95%CI: 1.22–2.99, modelo aditivo ajustado para sexo, idade, ancestralidade genética e comorbidades) (Tabelas 7C, Figura 3A). Apesar da maior frequência do alelo C entre os casos, este SNP não foi associado à susceptibilidade da doença no sexo masculino ($p > 0,05$ para todos os modelos, (Tabela 4C, Figura 3A). Comparando a frequência de genótipos de rs17576 de *MMP9* nas mulheres, inicialmente observamos que o alelo G (alelo menor) tende a contribuir para o risco da doença ($p = 0,05$, OR=1.51, 95%CI: 0.97–2.33; modelo aditivo ajustado para sexo, idade, ancestralidade genética e comorbidades (Tabela 7C). Quando todas as mulheres recrutadas foram avaliadas, proporcionando um tamanho de amostra maior, a variante rara de rs17576 mostrou associação

significativa quanto a susceptibilidade à doença ($p = 0,044$, modelo aditivo ajustado para sexo, idade e comorbidades, Figura 3B). No entanto, em um modelo considerando ambos rs2252070 e rs17576, a variante *MMP9* apenas mostrou tendência em contribuir para o risco de ombro congelado ($p = 0,05$; Tabela 6). No sexo masculino, a presença do alelo T de rs2277698 de *TIMP2* foi associada ao risco de ombro congelado em um modelo dominante ajustado para idade e ancestralidade ($p=0.035$, $OR=2.15$, $95\%CI: 1.06-4.36$, modelo aditivo) (Tabela 8B). No entanto, não foi um fator preditivo independente quando as comorbidades foram incluídas no modelo (Tabela 8C).

Os SNPs rs1800470 de *TGFBI* e rs1590 de *TGFBR1* também estiveram envolvidos na susceptibilidade de homens à doença ($p = 0,04$, modelo dominante e $p = 0,027$, modelo recessivo, respectivamente (Tabela 4C). A presença do alelo C de rs1800470 foi um fator protetor contra OC ($p = 0,04$ $OR=0.47$, $95\%CI: 0.23-0.96$, modelo dominante ajustado para sexo, idade, ancestralidade e comorbidades) (Tabela 8C). Os portadores de genótipo GG de rs1590 apresentaram um risco aumentado dessa condição ($p = 0,027$ $OR=4.11$, $95\%CI: 1.17-14.38$, modelo recessivo ajustado para sexo, idade, ancestralidade e comorbidades) (Tabela 8C). Essas variantes genéticas foram confirmadas como fatores de risco independentes para suscetibilidade ao ombro congelado quando todos os homens recrutados foram avaliados (Tabela 6, Figuras 3C-D). A Tabela 6 mostra os valores de p , OR e IC de 95% do modelo final, incluindo os SNP significativos e as variáveis clínicas como possíveis fatores preditivos ajustados para idade e sexo (quando necessário). É importante ressaltar que o diabetes era um fator de risco independente apenas entre as mulheres, e a dislipidemia era a única comorbidade que previa o risco de ombro congelado em homens ($p < 0,05$).

3) Haplótipos e risco de ombro congelado

Para as análises de haplótipos, apenas foram incluídos polimorfismos em EHW. Portanto, os haplótipos que envolvem polimorfismos *COL1A1* e *COL5A1* não foram avaliados. Houve forte desequilíbrio de ligação nos *loci* de *TGFBI*, *TGFBR1*, *MMP2*, *MMP3* e *MMP9*. Para comparações entre grupos, os valores de p foram primeiro ajustados para sexo, idade e ancestralidade genética. Comparando os haplótipos *MMP9* entre os casos e os controles, foi detectada associação significativa entre o haplótipo G / G (rs17576 / rs17577) e OC (p = 0,046, OR: 1,40, IC 95%: 1,01-1,95; Tabela 9) e quando apenas as mulheres foram avaliadas (p = 0,046, OR: 1,59, IC 95%: 1,01-2,51; Tabela 9). No sexo feminino, o haplótipo T / C / G (rs243865 / rs2285053 / rs243866 de *MMP2*) também foi associado ao risco de OC (p <0,0001; Tabela 9). No entanto, a frequência deste haplótipo foi baixa na população estudada. Esses achados foram confirmados na análise envolvendo todos os casos e controles recrutados com ajuste para idade, sexo e principais comorbidades (todos p >0,05; Tabela 10).

Tabela 9. Frequência de haplótipos nos grupos ombro congelado (OC) e controle.

Gene	Haplótipos	Total indivíduos				Feminino				Masculino				
		Total	Controle	Casos	Valor p ^a	Total	Controle	Casos	Valor p ^a	Total	Controle	Casos	Valor p ^a	
<i>TGFBI</i>	rs1800470/	A/G ^b	0.5184	0.5063	0.5488					0.5344	0.5201	0.5672		
	rs1800469	G/A	0.3867	0.3887	0.3811	0.5	0.3974	0.4034	0.3814	0.54	0.3715	0.3677	0.3806	0.72
		G/G	0.092	0.1008	0.0701	0.44	0.0921	0.0958	0.0825	0.82	0.0916	0.1084	0.0522	0.17
		A/A	0.0029	0.0042	NA	1	0.0032	0.0045	NA	1	0.0025	0.0038	NA	1
<i>TGFBR1</i>	rs11568785	A/T ^b	0.6525	0.6492	0.6616		0.6519	0.6452	0.6725		0.6532	0.6546	0.6493	
	/ rs1590	A/G	0.2873	0.293	0.2713	0.68	0.2897	0.2978	0.2657	0.71	0.2838	0.2865	0.2761	0.86
		G/T	0.0603	0.0578	0.0671	0.8	0.0583	0.057	0.0595	0.86	0.0629	0.0589	0.0746	0.54
		G/G	0	0	0	-	0	0	0.0024		0	0	0	-
<i>MMP2</i>	rs243865/	C/C/G ^b	0.6926	0.7026	0.6646		0.6806	0.6844	0.6701		0.7139	0.7359	0.6567	
	rs2285053/	T/C/A	0.1549	0.1427	0.189	0.52	0.1681	0.1597	0.1907	0.66	0.1321	0.111	0.1866	0.11
	rs243866	C/T/G	0.1517	0.1547	0.1433	0.46	0.15	0.1559	0.134	0.2	0.1493	0.1442	0.1567	0.7
		T/C/G	8.00E-04	NA	0.003	-	0.0014	NA	0.0052	<0.0001*	0.0047	0.0089	0	-
		T/T/A	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	1

<i>MMP3</i>	rs679620/	T/T ^b	0.4033	0.3971	0.4207		0.3861	0.3821	0.3969		0.427	0.4174	0.4552	
	rs522616	C/T	0.3094	0.3044	0.3232	0.59	0.3347	0.3213	0.3711	0.62	0.2745	0.2816	0.2537	0.99
		C/C	0.2861	0.2969	0.2561	0.42	0.2792	0.2966	0.232	0.34	0.2958	0.2975	0.291	0.88
		T/C	0.0012	0.0016	0	1	0	0	0	-	0.0026	0.0035	0	1
<i>MMP9</i>	rs17576/	A/G ^b	0.6808	0.6899	0.6555		0.6896	0.7064	0.6443		0.6688	0.6678	0.6716	
	rs17577	G/G	0.1884	0.1695	0.2409	0.046*	0.1854	0.1643	0.2423	0.046*	0.1925	0.1766	0.2388	0.44
		G/A	0.1278	0.1366	0.1037	0.41	0.1216	0.1247	0.1134	0.9	0.1364	0.1525	0.0896	0.23
		A/A	0.003	0.004	0	1	0.0034	0.0046	0	1	0.0024	0.0031	0	1

^aValor p ajustado por idade, gênero e ancestralidade genética ; ^breferência haplótipa. *Diferença significativa entre os grupos; p<0.05.

Tabela 10. Frequências de haplótipos nos grupos ombro congelado (OC) e controles.

Gene	Haplótipo	Total de indivíduos				Femininos				Masculinos				
		Total	Controles	Casos	p-value ^a	Total	Controles	Casos	p-value ^a	Total	Controles	Casos	p-value ^a	
<i>MMP2</i>	rs243865/ rs2285053/ rs243866	C/C/G ^b	0,6911	0,7055	0,6453		0,6752	0,6887	0,6389		0,7126	0,7266	0,6575	
		T/C/A	0,1587	0,1465	0,1974	0,098	0,1737	0,1613	0,2069	0,41	0,1457	0,1407	0,1644	0,62
		C/T/G	0,1483	0,1471	0,152	0,63	0,1487	0,15	0,1454	0,88	0,1379	0,1277	0,1781	0,26
		T/C/G	0,0019	0,0008	0,0053	0,11	0,0024	NA	0,0088	<0.0001*	0,0014	0,0017	NA	1
		T/T/A	0	0	0	-	0	0	0	-	0,0024	0,0033	0	-
<i>MMP9</i>	rs17576/ rs17577	A/G ^b	0,6666	0,673	0,6474		0,6809	0,6973	0,6379		0,6501	0,6467	0,6644	
		G/G	0,2011	0,1886	0,2404	0,033*	0,1937	0,1753	0,2429	0,022*	0,2106	0,2031	0,2397	0,41
		G/A	0,1299	0,1354	0,1122	0,41	0,1224	0,1234	0,1192	0,94	0,1376	0,148	0,0959	0,18
		A/A	0,0024	0,0031	0	1	0,003	0,004	0	1	0,0017	0,0022	0	1

^ap-value ajustado por idade, sexo, pressão alta, diabetes e hipotiridismo

^bhaplótipo de referência

*Diferença significante entre os grupos; p<0.05

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O presente estudo fornece evidências adicionais de que o ombro congelado (OC) é uma doença complexa que envolve fatores de risco ambientais e genéticos. Para esse estudo foram recrutados 786 indivíduos, sendo 186 casos de OC, resultando em uma amostra de casos com prevalência em mulheres e idade média correspondentes à literatura da doença (NEVIASER, HANNAFIN, 2010). A associação significativa da dislipidemia em toda amostra já foi previamente referida em estudos, bem como a forte associação do hipotireoidismo e a população feminina com OC, vem sendo reforçada nos estudos mais recentes (SCHIEFER *et al*, 2017).

A amostra de 600 controles obtidos, pareados por idade, apresentou frequência significativamente mais elevada de hipertensão arterial sistêmica (HAS). O achado vai de acordo com o estudo que mostra que indivíduos com OC tem 7% menos chance de desenvolver HAS (KINGSTON *et al*, 2018). O diabetes melito também foi mais frequente nesse grupo, ao contrário do que sugere a literatura, que demonstra incidência aumentada na população com OC (ZREIK, MALIK, CHARALAMBOUS, 2016). Acreditamos que, devido ao fato de uma parte dessa amostra controle ter sido coletada no Laboratório Central do Hospital São Paulo-UNIFESP, podemos ter selecionado uma população mais acometida para essas doenças específicas nos dias de coleta.

Identificamos SNPs ou haplótipos que foram fatores de risco independentes para essa doença, mesmo em modelos que incluíam comorbidades comuns como covariáveis. O interesse do grupo envolvido nessa linha de pesquisa é catalogar diferentes polimorfismos relacionados ao ombro congelado, uma vez que o perfil genômico permite definir um banco

de marcadores genéticos que podem contribuir para a previsão do risco da doença (MANSKE, PROHASKA, 2008). Dessa forma, o conhecimento das bases moleculares pode ajudar no desenvolvimento de melhores ferramentas de diagnóstico. Neste estudo, investigamos alguns genes que codificam proteínas da MEC ou proteínas envolvidas na homeostase da MEC e que podem contribuir para o risco do OC. Visto que o OC é uma doença de tratamento iminentemente clínico, ficaria inviável estudar a expressão desses genes no tecido capsular coletado durante procedimento cirúrgico e, dessa forma, optamos pelo estudo de polimorfismos no sangue periférico.

Entre os genes candidatos está a família de proteínas da metaloproteinase da matriz (MMPs), que pode exibir um papel fundamental na formação de ligações cruzadas anormais do colágeno em pacientes com ombro congelado idiopático (CUI *et al*, 2017).

Em 1998, HUTCHINSON *et al* documentaram que MMPs e TIMPs poderiam estar associados à patogênese do OC e da doença de *Dupuytren*. Um análogo de TIMP (*Marimastat*) foi administrado como tratamento anticancerígeno aos pacientes com câncer gástrico. Dos 12 que receberam tratamento, seis desenvolveram OC bilateral dentro de quatro meses, e três desenvolveram a contratura de *Dupuytren*. Dessa forma, atribuiu-se que o desenvolvimento de OC foi induzido por uma redução da relação MMP:TIMP. Desde então, vários estudos relataram padrões de expressão anormais de *MMPs* e *TIMPs* que podem causar uma falha na remodelação de colágeno em indivíduos com OC (BROWN, KELLY, McINNES, 2008, LUBIS, LUBIS, 2013).

Observamos que o alelo C de rs2252070 de *MMP13* se apresenta como fator de risco independente, e especialmente em portadores do sexo

feminino, podem apresentar maior suscetibilidade ao OC. Além disso, os portadores do genótipo CC são ainda mais suscetíveis. O polimorfismo rs2252070 é uma variante funcional localizada no sítio de ligação Sp1 (fator de transcrição) promotor de *MMP13*, que tem mostrado influência na expressão gênica (YOON *et al*, 2002). O Sp1 se liga no alelo C de rs2252070, mas não o alelo T, para promover a expressão de *MMP13* (SHI *et al*, 2016).

A MMP13 é uma importante metaloproteinase do tipo collagenase que cliva o principal componente estrutural da cartilagem, o colágeno tipo II, efetuando, assim, a perda irreversível da arquitetura e função da MEC. Polimorfismos de *MMP13* foram apontados como contribuintes para a predisposição à tendinopatia do músculo tibial posterior (rs2252070) (de ARAUJO MUNHOZ *et al*, 2016, *Erratum* 2017) na doença degenerativa dos discos intervertebrais (LI *et al*, 2016, HUA *et al*, 2017) no processo de degradação de matriz na artrite reumatóide (DRINDA *et al*, 2002) e na osteoartrite (ROWAN *et al*, 2008).

A expressão da collagenase MMP13 se mostrou significativamente elevada na amostra de tecido de nódulos dos pacientes operados para a doença de *Dupuytren*, onde ocorre elevado *turnover* do colágeno e elevados níveis de TIMP1, bloqueando a ação da MMP13 na quebra do colágeno, e foi apontada como possível responsável pelo processo de contratura e fibrose nesses indivíduos (JOHNSTON *et al*, 2007). O que reforça semelhanças previamente apontadas entre o processo de fibrose no OC e na doença de *Dupuytren* (HAND *et al*, 2007).

Os SNPs das MMP tipo gelatinases também podem contribuir para a suscetibilidade ao desenvolvimento de OC. Identificamos o haplótipo G

(alelo menor)/G (alelo principal) (rs17576 / rs17577) da *MMP9* como um fator de risco independente para a doença, especialmente em mulheres. Este haplótipo *MMP9* conferiu 1,4 vezes o risco de OC na população geral e, 1,7 vezes, o risco entre as mulheres. Embora menos preditivo do que o rs2252070 do *MMP13*, é importante notar que o alelo G do rs17576 de *MMP9* também estava associado ao risco de doença entre mulheres, independentemente do genótipo rs17577.

Tanto o rs17576 quanto o rs17577 são polimorfismos do tipo variantes de sentido trocado e, portanto, alteram um aminoácido da proteína *MMP9*, o que pode resultar em alteração da sua atividade. Sabe-se que rs17576 está localizado nos domínios de fibronectina tipo II específicos para *MMP9*, que presumivelmente aumentam a ligação do substrato (ALLAN *et al*, 1995, O'FARRELL, 2000), enquanto rs17577 estão localizados no domínio da hemopexina, o que parece afetar negativamente a ligação do substrato e do inibidor (LI *et al*, 1995, MURPHY, KNAUPER, 1997).

A FN1 está entre as proteínas com um domínio de fibronectina tipo II que pode ser degradado por *MMP9*. No entanto, a FN1 também é capaz de induzir um aumento da expressão de *MMP9* (SEN *et al*, 2010). A retroalimentação entre essas proteínas é importante pois, nesse contexto, sugere-se que a *MMP9* pode desempenhar um papel fundamental na modulação da reorganização tecidual mediada pela atividade contrátil dos fibroblastos por meio da liberação ou ativação de várias citocinas e fatores de crescimento, incluindo o TGF β 1 (KOBAYASHI *et al*, 2014). É importante ressaltar que, a expressão de RNAm da *FNI*, estava aumentada na cápsula de oito pacientes com OC em comparação aos controles em um estudo anterior do nosso grupo (COHEN *et al*, 2016) (ANEXO 2).

O haplótipo T (alelo menor) / C (alelo principal) / G (alelo principal) (rs243865 / rs2285053 / rs243866) da *MMP2* gelatinase também foi associado ao risco de desenvolvimento de OC, embora apenas no sexo feminino. Previamente, foi demonstrado que o gene da *MMP2* foi expresso com mais frequência no OC (BUNKER *et al.*, 2000). A MMP14 ligada à membrana é conhecida por ter um papel vital na ativação da MMP2. Pela ausência de mRNA de *MMP14* em todos os 14 indivíduos com OC, os autores sugerem um possível mecanismo para a resolução lenta da fibrose (BUNKER *et al.*, 2000). A MMP2 apresenta atividade proteolítica contra proteínas de matriz e não-matriz. Assim, espera-se que as variantes genéticas que afetam diretamente a expressão gênica e/ou a função proteica possam impactar a progressão de processos patológicos envolvendo a remodelação tecidual como OC (PRICE, GREAVES, WATKINS, 2001). O SNP rs243865 é um SNP funcional conhecido que interrompe um sítio Sp1 de *MMP2*. Foi demonstrado anteriormente que o alelo C rs243865 apresenta atividade e expressão aumentadas em relação ao alelo T (PRICE *et al.*, 2001). Vale ressaltar que o haplótipo T/C/G foi infrequente em nossa população. Assim, uma investigação mais aprofundada, em um grande conjunto de amostras, é necessária para elucidar como esse haplótipo afeta o risco de OC em mulheres.

Ambos os SNPs da *MMP13* e da *MMP2* que estiveram associados ao risco da OC estão situados em sítios da Sp1. Regiões ricas em sítios da Sp1 são influenciadas pela metilação do DNA (GRAFF JR *et al.*, 1997), um mecanismo dinâmico de regulação da expressão gênica. A metilação do DNA controla a expressão de MMPs nas lesões do ombro (LEAL MF *et al.*, 2017). Além disso, o impacto da metilação nos SNPs foi demonstrado na suscetibilidade à osteoartrite (REYNARD *et al.* 2014). Assim, a natureza

dinâmica do OC, com melhora progressiva da função do ombro, sugere que sítios de SNPs que têm um efeito no padrão de metilação do DNA podem desempenhar um papel fundamental na suscetibilidade à doença.

Em relação a *MMP3*, dois estudos anteriores em população chinesa sugeriram o envolvimento do SNP rs650108 no risco de OC (XU *et al*, 2016, CHEN *et al*, 2017). Nós não estudamos esse SNP, porém como XU *et al* (2016), avaliamos o SNP rs679620, e não detectamos uma associação significativa entre essa variante genética e o risco de OC ao ajustar para sexo e idade. Por outro lado, em nosso estudo, o genótipo CC de rs522616 (*MMP3*) foi significativamente mais comum entre os controles do que entre os pacientes com OC, após o ajuste para as mesmas variáveis. No entanto, os resultados não foram significativos, uma vez que a ancestralidade genética foi adicionada ao modelo. Este achado destaca a necessidade de ajuste de ancestralidade em um estudo genético, especialmente em populações miscigenadas, uma vez que a origem étnica pode influenciar a frequência alélica (MOURANT *et al*, 1976). Estudos genômicos de larga escala, como os projetos *HapMap* e *1000* genomas, demonstram que existe uma ampla gama de frequências de SNPs, entre populações de diferentes continentes. A Tabela 1 exemplifica o intervalo em frequências de SNPs mostrando a frequência do alelo raro dos genes estudados em populações africanas, ameríndias e europeias, de acordo com o projeto de *1000* genomas. Em populações com grande miscigenação (como a população brasileira e a maior parte do mundo desenvolvido), o estabelecimento de etnia para fins de pesquisa é uma tarefa imprecisa, e a aparência física pode não ser um indicador eficiente da ancestralidade de um indivíduo (PARRA *et al*, 2003, RAMOS *et al*, 2016). Portanto, a determinação de ancestralidade genética é essencial para evitar a descrição de SNPs associados ao risco de doença,

quando na verdade, os SNPs estão associados a uma subpopulação nas amostras estudadas.

Para elucidar se as variantes genéticas foram fatores preditivos independentes, em nosso estudo incluímos modelos de ancestralidade genética e fatores de risco epidemiológicos para a doença para evitar o viés de estratificação populacional, ou uma associação intrínseca entre os SNPs estudados e comorbidades anteriormente associadas à incidência de OC.

Nos homens, rs2277698 (*TIMP2*), rs1800470 (*TGFBI*) e rs1590 (*TGFBR1*) parecem estar envolvidos na suscetibilidade ao OC. No entanto, apenas rs1800470 e rs1590 foram preditores independentes de risco para OC. O alelo raro de rs1800470 (variantes de sentido trocado) parece ser um fator de proteção para OC. Por outro lado, o rs1590, localizado na região 3-UTR, que está envolvida na regulação da estabilidade do mRNA, e a homozigose da variante rara parece estar associada ao risco de doença. Os achados reforçam o envolvimento da sinalização do TGF β no OC, como nós previamente demonstramos por meio da análise de expressão gênica na cápsula acometida (COHEN *et al*, 2016) (ANEXO2).

O *TGFBI* é responsável pela regulação positiva de colágenos e, também, de outros componentes da matriz extracelular, todos fundamentais para a remodelação do tecido conjuntivo (BADALAMENTI *et al*, 1996). É, sem dúvida, uma das citocinas mais intimamente envolvidas no processo de fibrose, e está presente em grandes quantidades em locais de inflamação crônica (IGNOTZ, MASSAGUE, 1986, WAHL *et al*, 1993).

Na doença de Dupuytren, *TGFBI* tem sido sugerido para desempenhar um papel predominante na modulação da fibrose e inflamação (BIANCHI *et*

al, 2015) e, está mais fortemente presente, na matriz extracelular e nas células do tecido acometido, do que no tecido e células normais correspondentes (KLOEN, 1999).

Vale ressaltar que nenhum dos SNPs associados ao OC no sexo feminino estavam significativamente associados ao risco dessa doença no masculino. Nas mulheres, os SNPs significativos foram localizados nos genes de MMPs, enquanto SNPs de *TGFBI* e *TGFBR1* foram associados com suscetibilidade nos homens. Não podemos excluir a possibilidade de que fatores genéticos distintos desempenhem papéis diferentes no desenvolvimento da doença, devido à interação e à função de diversas proteínas em vias hormônio- dependentes. Além disso, acreditamos que essa diferença de sexo pode ter interferido no fato de apenas *MMP13* rs2252070 ter se mostrado como preditor genético na análise, incluindo ambos os sexos.

A proporção de homens e mulheres em nosso estudo está de acordo com o predomínio da doença entre as mulheres (NEVIASER, HANNAFIN, 2010). Embora a população masculina seja pequena, o risco de OC em homens parece ser menos influenciado por comorbidades clínicas. Considerando a incidência da doença e a fraca influência de comorbidades na suscetibilidade à doença, o sexo masculino pode ser, em parte, considerado um fenótipo extremo. A seleção de indivíduos com fenótipos clinicamente relevantes, muito característicos, é uma abordagem intuitiva para estudar as causas subjacentes de uma doença. Essa estratégia, assume que esses pacientes são os mais informativos e, portanto, devem ser estudados separadamente, em vez de serem incluídos em uma série maior de pacientes que podem mascarar as informações encontradas (PEREZ-GRACIA *et al*, 2010).

A literatura atual favorece o entendimento do OC como uma doença multifatorial com importante componente genético (RYAN *et al*, 2016). Estudos de polimorfismos são válidos para avaliação de suscetibilidade e esclarecimento sobre os mecanismos etiopatogênicos da doença e nossos achados ajudam a reforçar essa hipótese.

Dentre os vários SNPs, rs1800012 (*COL1A1*) é o mais estudado e associado às doenças do tecido conjuntivo como a osteogênese imperfeita (MARINI, BLISSETT, 2013), osteoartrite (LOUGHLIN *et al*, 2000), lesões de partes moles (COLLINS, POSTHUMUS, SCHWELLNUS, 2010). Estudos prévios mostraram associação significativa do genótipo TT do polimorfismo rs1800012 com lesões tendíneas e ligamentares em uma população da Suécia (KHOSCHNAU *et al*, 2008) e da Polônia (FICEK *et al*, 2013), apesar dos achados não serem replicados em outro estudo com uma população polonesa (STEPIEN-SLODKOWSKA *et al*, 2013). Nenhuma associação significativa entre SNP rs1800012 foi encontrada em nosso estudo, bem como em pacientes com epicondilite lateral (ERDURAN *et al*, 2014), em dois trabalhos da África do Sul com lesões do ligamento cruzado anterior do joelho (POSTHUMUS *et al*, 2009, POSTHUMUS *et al*, 2009b) e outro na população caucasiana (JOHN *et al*, 2015).

Relevância do Estudo

O estudo conta com uma grande amostra de casos de ombro congelado, a maior encontrada na literatura dentro do tema. Ainda assim, apesar de numerosa, é pequena para um estudo de polimorfismos e, com isso, algumas análises estatísticas apresentaram baixo poder. No entanto, nossa

pesquisa demonstra a influência de novas variantes genéticas na etiologia do OC.

O estudo se diferencia por incluir análises de comorbidades clínicas relacionadas ao OC e pelo ajuste de ancestralidade genética demonstrando a importância de eliminar fatores de confusão dos resultados e, dessa forma, aliviar o viés de estratificação populacional e evitar resultados falsos positivos.

Os valores de p não foram ajustados para múltiplas comparações. No entanto, as variantes dos genes estudados foram selecionados com base na função destes em articulações e, assim, não se trata de um estudo aleatório “livre de hipótese”. Além disso, considerando a heterogeneidade demográfica dos pacientes e controles, nós priorizamos a correção para fatores clínicos e ancestralidade molecular que poderia levar a descrição de achados falso-positivos devido à estratificação da amostra.

O modelo de estudo utilizado nesse projeto pode ser estendido para o estudo de outros polimorfismos que podem estar associados ao OC e além disso, pode ser replicado para o estudo de associação genética de outras doenças ortopédicas.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O estudo reforça o caráter multifatorial do ombro congelado com a identificação de polimorfismos genéticos envolvidos na doença. Enquanto os SNPs significativos para o sexo feminino foram localizados nos genes das MMPs, nos homens a susceptibilidade à doença esteve associada aos SNPs de *TGFB1* e *TGFBRI*. Apenas o polimorfismo rs2252070 de *MMP13*, apresentou risco aumentado ($p=0.002$, $OR=1.64$) para doença em ambos os sexos, principalmente portadores do genótipo CC.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem.* 1995; 270:5872-6.
- Ali-Labib R, Louka ML, Galal IH, Tarek M. Evaluation of matrix metalloproteinase-2 in lung cancer. *Proteomics Clin Appl.* 2014 Apr; 8(3-4):251-7.
- Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J.* 1995; 309 (Pt 1):299-306.
- Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003; 28:12–24.
- Andersen NH, Sojbjerg JO, Johannsen HV, Sneppen O. Frozen shoulder: arthroscopy and manipulation under general anesthesia and early passive motion. *J Shoulder Elbow Surg.* 1998; 7(3):218-22.
- Antony B, Jones G, Venn A, Cicuttini F, March L, Blizzard L, et al. Association between childhood overweight measures and adulthood knee pain, stiffness and dysfunction: a 25-year cohort study. *Annals of the rheumatic diseases.* 2015; 74:711-7. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204161.
- Badalamenti MA, Sampson SP, Hurst LC, Dowd A, Miyasaka K. The role of TGF-beta in Dupuytren's disease. *J Hand Surg.* 1996; 21A, 210–215]

- Baker AT, Ramshaw JA, Chan D, Cole WG, Bateman JF. Changes in collagen stability and folding in lethal perinatal osteogenesis imperfecta. The effect of alpha 1 (I)-chain glycine-to-arginine substitutions. *Biochem J.* 1989; 261: 253-7.
- Becker K, Tinschert S, Lienert A, Bleuler PE, Staub F, Meinel A, et al. The importance of genetic susceptibility in Dupuytren's disease. *Clin Genet.* 2015 May; 87(5):483-7. [Epub 2014: doi: 10.1111/cge.12410 PMID: 24749973].
- Belangero PS, Leal MF, de Castro Pochini A, Andreoli CV, Ejnisman B, Cohen M. Profile of collagen gene expression in the glenohumeral capsule of patients with traumatic anterior instability of the shoulder. *Rev Bras Ortop.* 2014a; 49: 642-6.
- Belangero PS, Leal MF, Figueiredo EA, Cohen C, Pochini Ade C, Smith MC, et al. Gene expression analysis in patients with traumatic anterior shoulder instability suggests deregulation of collagen genes. *J Orthop Res.* 2014b; 32: 1311-6.
- Belangero PS, Leal MF, Cohen C, Figueiredo EA, Smith MC, Andreoli CV, et al. Expression analysis of genes involved in collagen cross-linking and its regulation in traumatic anterior shoulder instability. *J Orthop Res.* 2016a; 34: 510-7.
- Belangero PS, Leal MF, Figueiredo EA, Cohen C, Andreoli CV, Smith MC, et al. Differential expression of extracellular matrix genes in glenohumeral capsule of shoulder instability patients. *Connect Tissue Res.* 2016b; 57: 290-8.

- Bendrik C, Robertson J, Gauldie J, Dabrosin C [Gene transfer of matrix metalloproteinase-9 induces tumor regression of breast cancer in vivo. *Cancer Res.* 2008 May 1; 68(9):3405-12.
- Bianchi E, Taurone S, Bardella L, Signore A, Pompili E, Sessa V, Chiappetta C, Fumagalli L, Di Gioia C, Pastore FS, Scarpa S, Artico M. Involvement of pro-inflammatory cytokines and growth factors in the pathogenesis of Dupuytren's contracture: a novel target for a possible future therapeutic strategy? *Clin Sci (Lond).* 2015 Oct 1; 129(8):711-20. [doi: 10.1042/CS20150088. Epub 2015 Jun 11].
- Birkedal-Hansen H¹, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(2):197-250.
- Bing DH, Almeda S, Isliker H, Lahav J, Hynes RO. Fibronectin binds to the C1q component of complement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79: 4198-201.
- Blaine TA, Kim YS, Voloshin I et al. The molecular pathophysiology of subacromial bursitis in rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg.* Jan-Feb 2005; 14(1 Suppl S):S84– S89.
- Brown IDM, Kelly IG, McInnes IB. Detection of matrix metalloproteinases in primary frozen shoulders. *J Bone Joint Surg Br.* 2008; 90-B (Supp II):364.).
- Bunker TD, Anthony PP. The pathology of frozen shoulder. A Dupuytren-like disease. *J Bone Joint Surg [Br].* 1995; 77(5):677–83.
- Bunker TD, Lagas K, DeFerme A. Arthroscopy and manipulation in frozen shoulder. *J Bone Joint Surg [Br].* 1994; 76(Supp):53.

- Bunker TD, Reilly J, Baird KS, Hamblen D L. Expression of growth factors, cytokines and matrix metalloproteinases in frozen shoulder. *J Bone Joint Surg [Br]*; 82(5):768-73, 2000.
- Buttice G, Quinones S, Kurkinen M. The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of human stromelysin gene. *Nucleic Acids Res*; 19:3723-31, 1991.
- Cakir M, Samanci N, Balci MK. Musculoskeletal manifestations in patients with thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003; 59(2):162-167.
- Capstick R, Bragg T, Giele H, Furniss D. Sibling recurrence risk in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Eur*. 2013; 38:424-429.)
- Checchia SL, Fregonezze M, Myiazaki NA, Santos PD, da Silva LA, Ossada A, Rosenthal A, Avakian R. Tratamento da capsulite adesiva com bloqueios seriados do nervo supra-escapular. *Rev Bras Ortop*. 2006; 41(7):245-52.
- Chen J, Phadnis J. Glenohumeral Capsule and Ligaments. IN: Bain G, Itoi E, Di Giacomo G, Sugaya H (eds). *Normal and Pathological Anatomy of the Shoulder*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015, 93-9p.
- 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 β* , *MMP-3*, *TGF- β 1*, and *GDF5* Polymorphisms and Their Association with Primary Frozen Shoulder in a Chinese Han Population. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:3681645. [doi: 10.1155/2017/3681645. Epub 2017 Jun 6].
- Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 May 1; 3(5).
- Choi KH, Lee HB, Jeong MY, Rhee YK, Chung MJ, Kwak YG, Lee YC. The role of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of

- metalloproteinase-1 in cryptogenic organizing pneumonia. *Chest*; 121:1478–85, 2002.
- Chowdhury A, Brinson R, Wei B, Stetler-Stevenson WG. Tissue Inhibitor of Metalloprotease-2 (TIMP-2): Bioprocess Development, Physicochemical, Biochemical, and Biological Characterization of Highly Expressed Recombinant Protein. *Biochemistry*. 2017 Dec 12; 56(49):6423-33.
- Clark AG. The role of haplotypes in candidate gene studies. *Genet Epidemiol*. 2004 Dec; 27(4):321-33.
- Codman EA. The shoulder: rupture of the supraspinatus tendon and other lesions in or about the subacromial bursa, 1934, Boston, Mass [Thomas Todd Co].
- Cohen M, Amaral MV, Brandão BL, Pereira MR, Monteiro M, Motta GR. Avaliação dos resultados do tratamento cirúrgico artroscópico da capsulite adesiva. *Rev Bras Ortop*. 2013; 48(3):272-7.
- Cohen C, Ejnisman B. Epidemiology of frozen shoulder. IN: Itoi E, Arce G, Bain GI, Diercks RL, Guttman D, Imhoff AB, Mazzocca AD, Sugaya H, Yoo YS: *Shoulder Stiffness*, Ed 2015, Springer: Heidelberg; 21-30p.
- Cohen C, Leal MF, Belangero PS, et al. The roles of Tenascin C and Fibronectin 1 in adhesive capsulitis: a pilot gene expression study. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016; 71(6):325-331.
- Collins M, Posthumus M, Schwelinus MP. The COL1A1 gene and acute soft tissue ruptures. *Br J Sports Med*. 2010 Nov; 44(14):1063-4.
- Constantin A, Lauwers-Cances V, Navaux F, Abbal M, van Meerwijk J, Mazieres B, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A Stromelysin 1 (matrix metalloproteinase 3) and HLA-DRB1 gene polymorphisms:

- Association with severity and progression of rheumatoid arthritis in a prospective study. *Arthritis Rheum.* 2002b; 46:1754-62.
- Cui J, Zhang T, Xiong J, Lu W, Duan L, Zhu W, Wang D. RNA-sequence analysis of samples from patients with idiopathic adhesive capsulitis. *Mol Med Rep.* 2017 Nov; 16(5):7665-72.
- D'Alessio M, Ramirez F, Blumberg BD, Wirtz MK, Rao VH, Godfrey MD, Hollistern DW. Characterization of a COL1A1 splicing defect in a case of Ehlers-Danlos syndrome type VII: further evidence of molecular homogeneity. *Am J Hum Genet.* 1991 Aug; 49(2):400-6.
- Dallas SL, Sivakumar P, Jones CJ, et al. Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1. *J Biol Chem.* 2005; 280(19):18871-80.
- de Araujo Munhoz FB, Baroneza JE, Godoy-Santos A, Fernandes TD, Branco FP, Alle LF, de Souza RL, Dos Santos MC. Posterior tibial tendinopathy associated with matrix metalloproteinase 13 promoter genotype and haplotype. *J Gene Med.* 2016 Nov; 18(11-12):325-330. doi: 10.1002/jgm.2934. *Erratum in:* *J Gene Med.* 2017 Sep; 19(9-10):.
- Di Colandrea T, Wang L, Wille J, d'Armiento J, Chada KK. Epidermal expression of collagenase delays wound-healing in transgenic mice. *J. Invest Dermatol*, 111: 1029-33, 1998.
- Dolmans GH, Werker PM, Hennies HC, et al. Wnt signaling and Dupuytren's disease. *N Engl J Med.* 2011; 365:307-317.
- Drinda S, Franke S, Canet CC, Petrow P, Bräuer R, Hüttich C, Stein G, Hein G. Identification of the advanced glycation end products N(epsilon)-

- carboxymethyllysine in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2002 Jun; 61(6):488-92.
- Duplay S. De la péri-arthrite scapulo-humérale et des raideurs de l'épaule qui en sont la conséquence. *Arch Gen Med*. 1872; 20:513-4.
- Duplay S. De la periarthrite scapulo-humerale. *Rev Frat D Trav de Med*. 1896; 53:226p.
- Ebner R, Chen RH, Lawler S, Zioncheck T, Derynck R. Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF-beta or activin. *Science*; 1993; 262:900-2.
- Erduran M, Altinisik J, Meric G, Ates O, Ulusal AE, Akseki D. Is Sp1 binding site polymorphism within COL1A1 gene associated with tennis elbow? *Gene*. 2014; 537:308–311.
- Ferreira Filho AA. Capsulite Adesiva. *Rev Bras Ortop*. 2005; 40(10):565-74.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet*. 2006; 7:85-97.
- Ficek K, Cieszczyk P, Kaczmarczyk M, Maciejewska-Karlowska A, Sawczuk M, Cholewinski J, Leonska-Duniec A, Stepień-Słodkowska M, Zarebska A, Stepto NK, Bishop DJ, Eynon N. Gene variants within the COL1A1 gene are associated with reduced anterior cruciate ligament injury in professional soccer players. *J Sci Med Sport / Sports Medicine Australia*. 2013; 16:396–400.
- Fichard A, Kleman JP, Ruggiero F. Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biol* 1995; 14:515-31.

- Finsen V, Dalen H, Nesheim J. The prevalence of Dupuytren's disease among 2 different ethnic groups in northern Norway. *J Hand Surg Am.* 2002; 27:115–117.
- Fu Z, Xu S, Xu Y, Ma J, Li J, Xu P. The expression of tumor-derived and stromal-derived matrix metalloproteinase 2 predicted prognosis of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2015; 25:356–262. [doi: 10.1097/IGC.0000000000000386].
- Geoghegan JM, Forbes J, Clark DI, Smith C, Hubbard R. Dupuytren's disease risk factors. *J Hand Surg Br.* 2004 Oct; 29(5):423-6.
- Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2011 Jan; 278(1):16-27. [doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x. Epub 2010 Nov 19].
- Godinho GG, Freitas JMA. Capsulite adesiva: tratamento cirúrgico artroscópico. *IN: Pardini AG, Souza G, Godinho GG. Clin Ortop (Rio de Janeiro).* 2000; 1(1):203-6p.
- Godinho GG, Sampaio TC. Capsulite adesiva: tratamento conservador. *IN: Pardini AG, Souza G, Godinho GG. Clin Ortop (Rio de Janeiro).* 2000; 1(1):197-202p.
- Godinho GG, Souza JM, Marques GL, Paio TCEV, Vieira AW. Capsulite Adesiva. *Rev Bras Ortop.* Set 1995; 30(9).
- Graff JR, Herman JG, Myohanen S, Baylin SB, Vertino PM. Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J Biol Chem.* 1997; 272:22322-9.

- Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet*; 1996; 14: 203-5.
- Greenspan DS, Byers MG, Eddy RL, Cheng W, Jani-Sait S, Shows TB. Human collagen gene COL5A1 maps to the q34.2- - -q34.3 region of chromosome 9, near the locus for nail-patella syndrome. *Genomics*. 1992 Apr; 12(4):836-7.
- Grey RG. The natural history of “idiopathic” frozen shoulder. *J Bone Joint Surg Am*. 1978; 60(4):564.
- Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*; 2006; 312: 117-21.
- Hakim AJ, Cherkas LF, Spector TD, MacGregor AJ. Genetic associations between frozen shoulder and tennis elbow: a female twin study. *Rheumatology*. 2003; 42(6):739–42.
- Hanabayashi M, Takahashi N, Sobue Y et al. Hyaluronan oligosaccharides induce MMP-1 and -3 via transcriptional activation of NF- κ B and p38 MAPK in rheumatoid synovial fibroblasts. *PloS One*. 11(8): e0161875p, 2016.
- Hand GC, Athanasou NA, Matthews T, Carr AJ. The pathology of frozen shoulder. *J Bone Joint Surg [Br]*; 89(7):928- 32, 2007.
- Hand C, Clipsham K, Rees JL, Carr AJ et al. Long-term outcome of frozen shoulder. *J Shoulder Elbow Surg*. 2008; 17(2):231–6.
- Hannafin, JA, Chiaia TA. Adhesive capsulitis. A treatment approach. *Clin Orthop Relat Res*. 2003; 372:95-109

- Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, Humphries S. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88:8154-8, 1991.
- Hindocha S, John S, Stanley JK, Watson SJ, Bayat A. The heritability of Dupuytren's disease: familial aggregation and its clinical significance. *J Hand Surg Am*. 2006; 31:204–210.
- Hirschhorn P, Schmidt JM. Frozen shoulder in identical twins. *Joint Bone Spine*. 2000 Jan; 67(1):75-6.
- Hsu JE, Anakwenze OA, Warrender WJ, Abboud JA. Current review of adhesive capsulitis. *J Shoulder Elbow Surg*. 2011; 20(3):502-14.
- Hutchinson JW, Tierney GM, Parsons SL, Davis TRC. “Dupuytren's disease and frozen shoulder induced by treatment with a matrix metalloproteinase inhibitor. *J Bone Joint Surg [B]*; 80(5):907-8, 1998.
- 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 Nov; 68:424–9.
- Hua WB, Wu XH, Zhang YK, Song Y, Tu J, Kang L, Zhao KC, Li S, Wang K, Liu W, Shao ZW, Yang SH, Yang C. Dysregulated miR-127-5p contributes to type II collagen degradation by targeting matrix metalloproteinase-13 in human intervertebral disc degeneration. *Biochimie*. 2017 Aug; 139:74-80.

- Huang J, Luo H, Wei W, Hou Y. A novel method for the analysis of 20 multi-indel polymorphisms and its forensic application. *Electrophoresis*. 2014 Feb; 35(4):487-93. [doi:10.1002/elps.201300346].
- Ignotz RA, Massague J. Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*; 261:4337-45, 1986.
- Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*; 1996 Jun 21; 271:14657-60.
- Itoi E, Arce G, Bain GI, Diercks RL, Guttman D, Imhoff AB, Mazzocca AD, Sugaya H, Yoo YS. Shoulder Stiffness: Current Concepts and Concerns. *Arthroscopy*. 2016; 32(7):1402-14.
- Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Hurme T, Kvist M, Peltou-Huikko M, Kalimo H, Jarvinen M: Mechanical loading regulates the expression of tenascin-C in the myotendinous junction and tendon but does not induce de novo synthesis in the skeletal muscle. *J Cell Sci*. 2003; 116:857-66.
- Johnston P, Chojnowski AJ, Davidson RK, Riley GP, Donell ST, Clark IM. A complete expression profile of matrix-degrading metalloproteinases in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am*. 2007 Mar; 32(3):343-51.
- Jones S, Hanchard N, Hamilton S, Rangan A. A qualitative study of patients' perceptions and priorities when living with primary frozen shoulder. *BMJ Open*. 2013; 3(9):e003452. [doi:10.1136/bmjopen-2013-003452].
- John R, Dhillon M, Prabhakar S, Anand A. Association of Gene Polymorphisms in COL1A1 and COL12A1 with ACL Tears - A Study in the Indian Population. *International Journal of Conference*

- Proceedings. 2015. (2015 IJCP), May 2015. [Internet disponível: <https://www.researchgate.net/publication/300116972>, 07/11/2018].
- Jost B, Koch PP, Gerber CH. Anatomy and functional aspects of the rotator interval. *J Shoulder Elbow Surg*; 9:336-41, 2000.
- Kabbabe B, Ramkumar S, Richardson M. Cytogenetic analysis of the pathology of frozen shoulder. *Inter J Shoulder Surgery*; 4(3):75–8, 2010.
- Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumors growth and invasion. *Ann Med*. 1999; 31(1):32-45.
- Kaltsas DS. Comparative study of the properties of the shoulder joint capsule with those of other joint capsules. *Clin Orthop Relat Res*. 1983; (173):20-26.).
- Kamoun-Goldrat A, Martinovic J, Saada J, Sonigo-Cohen P, Razavi F, Munnich A, et al. Prenatal cortical hyperostosis with COL1A1 gene mutation. *Am J Med Genet [A]*. 2008; 146A:1820-4.
- Kanbe K, Inoue K, Inoue Y, Chen Q. Inducement of mitogen-activated protein kinases in frozen shoulders. *J Orthop Sci [official journal of the Japanese Orthopaedic Association]*; 14(1):56-61, 2009.
- Karsenty G, Park RW. Regulation of type I collagen genes expression. *Int Rev Immunol*. 1995; 12: 177-85.
- Khoschnau S, Melhus H, Jacobson A, Rahme H, Bengtsson H, Ribom E, et al. Type I collagen alpha1 Sp1 polymorphism and the risk of cruciate ligament ruptures or shoulder dislocations. *Am J Sports Med*. 2008; 36: 2432-6.

- Kloen P. New insights in the development of Dupuytren's contracture: a review. *Br J Plast Surg*; 52:629–635, 1999.
- Kingston K, Curry EJ, Galvin JW, Li X. Shoulder adhesive capsulitis: epidemiology and predictors of surgery. *J Shoulder Elbow Surg*. 2018 Aug; 27(8):1437-1443. [doi: 10.1016/j.jse.2018.04.004. Epub 2018 May 25].
- Kobayashi T, Kim H, Liu X, Sugiura H, Kohyama T, Fang Q, Wen FQ, Abe S, Wang X, Atkinson JJ, Shipley JM, Senior RM, Rennard SI. Matrix metalloproteinase-9 activates TGF- β and stimulates fibroblast contraction of collagen gels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Jun 1; 306(11):L1006-15.
- Krieg T, Abraham D, Lafyatis R. Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9(Suppl2):S4.
- Kusukawa J, Sasaguri Y, Mormatsu M and Kameyama T. Expression of matrix metalloproteinase-3 in stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995; 53:530-4.
- Larsen S, Krogsgaard DG, Aagaard Larsen L, Iachina M, Skytthe A, Frederiksen H. Genetic and environmental influences in Dupuytren's disease: A study of 30,330 Danish twin pairs. *J Hand Surg Eur*. 2015 Feb; 40(2): 171–6.
- Leal MF, Caires Dos Santos L, Martins de Oliveira A, Santoro Belangero P, Antonio Figueiredo E, Cohen C, Alves FS, Yanaguizawa WH, Andreoli CV, Pochini AC, Ejnisman B, Smith MC, Alves MTS, Cohen M. Epigenetic regulation of metalloproteinases and their inhibitors in

- rotator cuff tears. PLoS One. 2017 Sep 13; 12(9):e0184141. [Internet: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184141>].
- Lech O, Sudbrack G, Valenzuela Neto C. Capsulite adesiva ("ombro congelado"). Abordagem multidisciplinar. Rev Bras Ortop. Set 1993; 28(9).
- Lehnert SA, Akhurst RJ. Embryonic expression pattern of TGF beta type-1 RNA suggests both paracrine and autocrine mechanisms of action. Development. 1988 Oct; 104(2):263-73.
- Lemjabbar H, Gosset P, Lechapt-Zalcman E, Franco-Montoya ML, Wallaert B, Harf A, Lafuma C. Overexpression of alveolar macrophage gelatinase B (MMP-9) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: effects of steroid and immunosuppressive treatment. Am J Respir Cell Mol Biol; 20: 903–13, 1999.
- Leong DJ, Gu XI, Li Y, Lee JY, Laudier DM, Majeska RJ *et al.* Matrix metalloproteinase-3 in articular cartilage is upregulated by joint immobilization and suppressed by passive joint motion. Matrix Biol. (2010) Jun; 29(5):420-6. [doi: 10.1016/j.matbio.2010.02.004].
- Lho YM, Ha E, Cho CH *et al.* Inflammatory cytokines are overexpressed in the subacromial bursa of frozen shoulder. J Shoulder Elbow Surg; 22(5):666-72, 2013.
- Li HR, Cui Q, Dong ZY, Zhang JH, Li HQ, Zhao L. Downregulation of miR-27b is involved in loss of type II collagen by directly targeting matrix metalloproteinase 13 (MMP13) in human intervertebral disc degeneration, Spine (Phila Pa 1976). 2016 Feb; 41(3):E116-23.
- Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, et al. STrengthening the REporting of Genetic Association studies

- (STREGA)-an extension of the STROBE statement. *Eur J Clin Invest.* 2009; 39:247-66.
- Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest;* 110:625–32, 2002.
- Loughlin J, Sinsheimer JS, Mustafa Z, Carr AJ, Clipsham K, Bloomfield VA, Chitnavis J, Bailey A, Sykes B, Chapman K. Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene COL1A1, and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis. *The Journal of rheumatology.* 2000; 27:779–784.
- Lubis AMT, Lubis VK. Matrixmetalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and transforming growth factor- beta 1 in frozen shoulder, and their changes as response to intensive stretching and supervised neglect exercise. *J Orthop Sci;* 18(4):519–27, 2013.
- Madlener M, Parks WC, Werner S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially regulated during excisional skin wound repair in mice. *Exp Cell Res.* 1998; 242:201–11.
- Mandal M, Mandal A, Das S, Chakraborti T, Chakraborti S. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biochem.* 2003; 252:305–29.
- Manske RC, Prohaska D. Diagnosis and management of adhesive capsulitis. *Curr Rev Musculoskelet Med.;* 1(3-4):180-9, 2008.
- Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec; 26(3-4):717-24.

- Marini JC, Blissett AR. New genes in bone development: what's new in osteogenesis imperfecta. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*; 98:3095–103, 2013.
- Marini JC, Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S, *et al.* Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat* 2007; 28: 209-21.
- Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000 Nov; 71(11):1699-707.
- Michou L, Lermusiaux JL, Teyssedou JP, Bardin T, Beaudreuil J, Petit-Teixeira E. Genetics of Dupuytren's disease. *Joint Bone Spine.* 2012 Jan; 79(1):7-12. [doi: 10.1016/j.jbspin.2011.05.027. Epub 2011 Jul 30].
- Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebault A, Chan E, *et al.* Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med.* 2009; 15: 774-80.
- Milgrom C, Novack V, Weil Y, Jaber S, Radeva-Petrova DR, Finestone A. Risk factors for idiopathic frozen shoulder. *Isr Med Assoc J.* 2008; 10(5):361-4.
- Mittal R, Patel AP, Debs LH *et al.* Intricate functions of matrix metalloproteinases in physiological and pathological conditions. *J Cell Physiol.* 2016;231(12):2599-2621.

- Mokone GG, Gajjar M, September AV, Schweltnus MP, Greenberg J, Noakes TD, Collins M. The guanine-thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C gene is associated with achilles tendon injuries. *Am J Sports Med*; 33:1016-21; 2005.
- Mokone GG, Schweltnus MP, Noakes TD, Collins M. The COL5A1 gene and Achilles tendon pathology. *Scand J Med Sci Sports*; 16:19–26, 2006.
- Moore-Smith L, Pasche B. TGFBR1 signaling and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*; 16(2):89-95, 2011.
- Mourant AE, Kopec AC, Domaniewska-Sobczak K. The distribution of the human blood groups. Oxford: Oxford University Press; 1976.
- Murphy G, Knauper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol*. 1997;15(8-9):511-518.
- Myiazaki NA, Santos PD, da Silva LA, Sella GV, Carrenho L, Checchia SL. Avaliação dos resultados do tratamento artroscópico da capsulite adesiva do ombro. *Rev Bras Ortop*; 52(1):61-8, 2017.
- Neer CS 2nd, Saterlle CC, Dalsey RM, Flatow EL. The anatomy and potential effects of contracture of the coracohumeral ligament. *Clin Orthop Relat Res*; 280:182-5, 1992.
- Neviaser AS, Hannafin JA. Adhesive capsulitis: a review of current treatment. *Am J Sports Med*; 38(11):2346-56, 2010.
- Neviaser JS. Adhesive capsulitis of the shoulder. *J Bone Joint Surg*; 27:211-22, 1945.

- Neviaser JS. Arthrography of the shoulder joint: study of the findings in adhesive capsulitis of the shoulder. Study of the findings in adhesive capsulitis of the shoulder. *J Bone Joint Surgery*; 44-A:1321–59, 1962.
- Nicholls AC, Oliver JE, McCarron S, Harrison JB, Greenspan DS, Pope FM. An exon skipping mutation of a type V collagen gene (COL5A1) in Ehlers-Danlos syndrome. *J Med Genet*. 1996; 33: 940-6.
- Niyibizi C, Smith P, Mi Z, Robbins P, Evans C. Potential of gene therapy for treating osteogenesis imperfecta. *Clin Orthop Relat Res*; S126-33, 2000.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson – *Genética Médica*. 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- O'Farrell TJ, Pourmotabbed T. Identification of structural elements important for matrix metalloproteinase type V collagenolytic activity as revealed by chimeric enzymes. Role of fibronectin-like domain and active site of gelatinase B. *J Biol Chem*; 275(36):27964-27972, 2000.
- Ogilvie-Harris DJ, Myerthall S. The diabetic frozen shoulder: arthroscopic release. *Arthroscopy*; 1391:1-8; 1997.
- Ogilvie-Harris DJ, Biggs DJ, Fitsialos DP, MacKay H. The resistant frozen shoulder: manipulation versus arthroscopic release. *Clin Orthop Relat Res*; (319):238-48, 1995.
- Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*; 264: 1860–9, 1989.

- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100(1):177-182, 2003.
- Pearson CA, Pearson D, Shibahara S, Hofsteenge J, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. *EMBO J*; 7:2977-82, 1988.
- Posthumus M, September AV, Keegan M, O'Cuinneagain D, Van der Merwe W, Schwellnus MP, Collins M. Genetic risk factors for anterior cruciate ligament ruptures: COL1A1 gene variant. *Br J Sports Med*; 2009a May 43(5):352-6.
- Posthumus M, September AV, Schwellnus MP, Collins M. Investigation of the Sp1-binding site polymorphism within the COL1A1 gene in participants with Achilles tendon injuries and controls. *Journal of science and medicine in sport. Sports Medicine Australia*; 12:184-189. 2009.
- Perez-Gracia JL, Gúrpide A, Ruiz-Ilundain MG, Alegria CA, Colomer R, García-Foncilla J, Bermejo IM. Selection of extreme phenotypes: the role of clinical observation in translational research. *Clin Transl Oncol*. 2010 Mar; 12(3):174-80.
- Perng DW, Chang KT, Su KC, Wu YC, Chen CS, Hsu WH, Tsai CM, Lee YC. Matrix metalloproteinase-9 induces transforming growth factor-beta (1) production in airway epithelium via activation of epidermal growth factor receptors. *Life Sci*; 89:204-12, 2011.
- Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in

- allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem*; 276(10):7549-7558, 2001.
- Radenkovic S, Konjevic G, Jurisic V, Karadzic K, Nikitovic M, Gopcevic K. Values of MMP-2 and MMP-9 in tumor tissue of basal-like breast cancer patients. *Cell Biochem Biophys*. 2014 Jan; 68(1):143-52. [Doi:10.1007/s12013-013-97011-x.]
- Ramos BR, D'Elia MP, Amador MA, Santos NP, da Cruz Castelli E, Witkin SS, Miot HÁ, Miot LD, da Silva MG. Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. *Genetica*. 2016 Jun; 144(3):259-65.
- Reeves B. The natural history of the frozen shoulder syndrome. *Scand J Rheumatol*; 4(4):193-6, 1975.
- Remst DF, Blaney Davidson EN, Vitters EL, van der Kraan PM. Unravelling osteoarthritis-related synovial fibrosis: a step closer to solving joint stiffness. *Rheumatology (Oxford)* Nov 54(11):1954-63, 2015
- Reynard LN, Bui C, Syddall CM, Loughlin J. CpG methylation regulates allelic expression of GDF5 by modulating binding of SP1 and SP3 repressor proteins to the osteoarthritis susceptibility SNP rs143383. *Hum Genet*. 2014; 133:1059-73.
- Riley G. *Sports injuries*. ed. New York: Oxford University Press, 2010.
- Riley GP, Harrall RL, Cawston TE, Hazleman BL, Mackie EJ. Tenascin-C and human tendon degeneration. *Am J Pathol*. 1996; 149: 933-43.
- Rockwood CA, Matsen III FA, Wirth MA, Lippitt SB. *The shoulder*. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders / Elsevier; 2009.

- Rodeo SA, Hannafin JA, Tom J, Warren RF, Wickiewicz TL. Immunolocalization of cytokines and their receptors in adhesive capsulitis of the shoulder. *J Orthop Res*; 15(3):427-436, 1997.
- Rowan AD, Litherland GJ, Hui W, Milner JM. Metalloproteases as potential therapeutic targets in arthritis treatment. *Expert Opin Ther Targets*. 2008 Jan; 12(1):1-18.
- Ryan V, Brown H, Minns Lowe CJ, Lewis JS. The pathophysiology associated with primary (idiopathic) frozen shoulder: A systematic review. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016 Aug 15; 17(1):340. [doi: 10.1186/s12891-016-1190-9].
- Ryu JD, Kirpalani PA, Kim JM, Nam KH, Han CW, Han SH. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the diabetic frozen shoulder. *J Shoulder Elbow Surg*. 2006 Nov 15(6):679-85.
- Sakai T, Yasuda K, Tohyama H, Azuma H, Nagumo A, Majima T, et al. Effects of combined administration of transforming growth factor-beta1 and epidermal growth factor on properties of the in situ frozen anterior cruciate ligament in rabbits. *J Orthop Res*; 20:1345-51, 2002.
- Savoie FH, Cohen C, Faust KC (2015). Rotator Cuff Interval. *IN: Bain G, Itoi E, Di Giacomo G, Sugaya H (eds): Normal and Pathological Anatomy of the Shoulder*. Springer, Berlin, Heidelberg. 101-108p. [DOI https://doi.org/10.1007/978-3-662-45719-1_11].
- Schiefer M, Teixeira PFS, Fontenelle C, Caminatti T, Santos DA, Righi LD, Conceição FL. Prevalence of hypothyroidism in patients with frozen shoulder. *J Shoulder Elbow Surg*; 26(1):49-55, 2017.

- Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*; 117:684–94, 2000.
- Sen T, Dutta A, Maity G, Chatterjee A. Fibronectin induces matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human laryngeal carcinoma cells by involving multiple signaling pathways. *Biochimie*; 92(10):1422-34, 2010.
- September AV, Schweltnus MP, Collins M. Tendon and ligament injuries: the genetic component. *Br J Sports Med*; 41:241-6, 2007.
- September AV, Cook J, Handley CJ, van der Merwe L, Schweltnus MP, Collins M: Variants within the COL5A1 gene are associated with Achilles tendinopathy in two populations. *Br J Sports Med*; 43:357–65, 2009.
- Shaw G. Polymorphism and single nucleotide polymorphisms (SNPs). *BJU Int*. 2013 Sep; 112(5):664-5.
- Shi M, Xia J, Xing H, Yang W, Xiong X, Pan W, Han S, Shang J, Zhou C, Zhou L, Yang M. The Sp1-mediated allelic regulation of MMP13 expression by an ESCC susceptibility SNP rs2252070. *Sci Rep*. 2016 Jun 1; 6:27013. [doi: 10.1038/srep27013].
- Smith S, Devaraj VS, Bunker TD. The association between frozen shoulder and Dupuytren's disease. *J Shoulder Elbow Surg*; 10:149- 51, 2001.
- Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*; 22(15):1928-9, 2006.

- Song KD, Kwon JW, Yoon YC, Choi SH. Indirect MR arthrographic findings of adhesive capsulitis. *AJR Am J Roentgenol*; 197(6):W1105–9, 2011. [doi:10.2214/AJR.10.6099].
- Starman BJ, Eyre D, Charbonneau H, Harrylock M, Weis MA, Weiss L, Graham JM jr, Byers PH. Osteogenesis imperfecta. The position of substitution for glycine by cysteine in the triple helical domain of the pro alpha 1(I) chains of type I collagen determines the clinical phenotype. *J Clin Invest*; 84:1206-14, 1989.
- Stepien-Slodkowska M, Ficek K, Eider J, Leonska-Duniec A, Maciejewska-Karłowska A, Sawczuk M, Zarebska A, Jastrzebski Z, Grenda A, Kotarska K, Cieszczyk P. The +1245g/t polymorphisms in the collagen type I alpha 1 (colla1) gene in polish skiers with anterior cruciate ligament injury. *Biology of Sport*; 30:57–60, 2013.
- Tighe CB, Oakley WS Jr. The prevalence of a diabetic condition and adhesive capsulitis of the shoulder. *South Med J*; 101:591-5, 2008.
- Thomas SJ, McDougall C, Brown, Jaberoo MC, Stearns A, Ashraf R, Fisher M, Kelly IG. Prevalence of symptoms and signs of shoulder problems in people with diabetes mellitus. *J Shoulder Elbow Surg*. 2007; 16:748-51.
- Thompson & Thompson. *Genética Médica – 6ª. edição*. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. 2002; 76-84p.
- Uthoff HK, Boileau P. Primary frozen shoulder: global capsular stiffness versus localized contracture. *Clin Orthop Relat Res*; 456:79–84, 2007. [doi:10.1097/BLO.0b013e318030846d].
- Ulrich D, Hrynyschyn K, Pallua N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in sera and tissue of patients with

- Dupuytren's disease. *Plast Reconstr Surg*; 112:1279–86, 2003.
- Ulrich D, Lichtenegger F, Eblenkamp M, Repper D, Pallua N. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, aminoterminal propeptide of procollagen type III, and hyaluronan in sera and tissue of patients with capsular contracture after augmentation with trilucent breast implants. *Plast Reconstr Surg*; 114:229–36, 2004.
- Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*; 93:411–22, 1998.
- Wahl SM, Costa GL, Mizel DE, Allen JB, Skaleric U, Mangan DF. Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J Periodontol*; 64:450–455, 1993.
- Wang Y, Xu F, Chen J, Shen X, Deng Y, Xu L, Yin J, Chen H, Teng F, Liu X, Wu W, Jiang B, Guo DA. Matrix metalloproteinase-9 induces cardiac fibroblast migration, collagen and cytokine secretion: inhibition by salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytomedicine*; 19:13–9, 2011.
- Wang C, Li H, Chen K, Wu B, Liu H. Association of polymorphisms rs1800012 in COL1A1 with sports-related tendon and ligament injuries: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Apr 18; 8(16):27627–27634. [doi: 10.18632/oncotarget.15271].
- Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/ deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 2002 Oct; 71(4):854–62.

- Weerakkody RA, Vandrovцова J, Kanonidou C, Mueller M, Gampawar P, Ibrahim Y, Norsworthy P, Biggs J, Abdullah A, Ross D, Black HA, Ferguson D, Cheshire NJ, Kazkaz H, Grahame R, Ghali N, Vandersteen A, Pope FM, Aitman TJ. Targeted next-generation sequencing makes new molecular diagnoses and expands genotype-phenotype relationship in Ehlers-Danlos syndrome. *Genet Med*. 2016 Nov; 18(11):1119-27.
- Wenzhou Huang, Peng Ao, Jian Li, Tianlong Wu, Libiao Xu, Zhongbo Deng, Wenjie Chen, Changchang Yin, Xigao Cheng. Autophagy Protects Advanced Glycation End Product-Induced Apoptosis and Expression of MMP-3 and MMP-13 in Rat Chondrocytes. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:6341919. [Published *online* 2017 Feb 7. doi: 10.1155/2017/6341919].
- Williams FM, Kalson NS, Fabiane SM, Mann DA, Deehan DJ. Joint Stiffness Is Heritable and Associated with Fibrotic Conditions and Joint Replacement. *PLoS One*. 2015 Jul 21; 10(7):e0133629. [doi: 10.1371/journal.pone.0133629].
- Woessner JF, Jr. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci*; 732:11-21, 1994.
- 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. *Genetics and Molecular Research*; 15(1): 2016.
- Yan Y, Liang H, Li T, Li M, Li R, Qin Z, Li S. The MMP-1, MMP-2 and MMP-9 gene polymorphisms and susceptibility to bladder cancer: a meta-analysis. *Tumor Biol*. 2014 Apr; 35(4):3047-3052. doi:10.1007/s13277-013-1395-6.

- Yang S, Park DH, Ahn SH, Kim J, Lee JW, Han JY, Kim DK, Jeon JY, Choi KH, Kim W. Prevalence and risk factors of adhesive capsulitis of the shoulder after breast cancer treatment. *Support Care Cancer*. 2017 Apr; 25(4):1317-22. [doi [http://dx.doi.org/ 10.1007/s00520-016-3532-4](http://dx.doi.org/10.1007/s00520-016-3532-4)].
- 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 Oct; 21(6):487-98.
- Yoshida K, Murata M, Yamaguchi T, Matsuzaki K. TGF- β /Smad signaling during hepatic fibro-carcinogenesis (Review). *Int J Oncol*; 45:1363-71, 2014. [doi: 10.3892/ijo.2014.2552].
- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*; 14:163-76, 2000.
- Zagai U, Dadfar E, Lundahl J, Venge P, Skold CM. Eosinophil cationic protein stimulates TGF-beta1 release by human lung fibroblasts *in vitro*. *Inflammation*; 30:153-160, 2007.
- Zweers MC, Hakim AJ, Grahame R, Schalkwijk J. Joint hypermobility syndromes: the pathophysiologic role of tenascin-X gene defects. *Arthritis Rheum*; 50: 2742-9, 2004.
- Zreik NH, Malik RA, Charalambous CP. Adhesive capsulitis of the shoulder and diabetes: a meta-analysis of prevalence. *Muscles Ligaments Tendons J*; 6(1):26-34, 2016.

Zuckerman JD, Rokito A. Frozen shoulder: a consensus definition. *J Shoulder Elbow Surg*; 20:322-5, 2011. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.jse.2010.07.008>].

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

- Bireme. Centro Latinoamericano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. DeCS: descritores em ciências da saúde. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>.
- International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication [*Internet*]. Philadelphia (PA): ICMJE Secretariat office, American College of Physicians; [updated 2008 Oct; cited 2010 May 23]. Available from: URL: <http://www.icmje.org>.
- Projetos, Dissertações e Teses. Orientação Normativa: Guia Prático. Ferreira LM [Edição, Organização, Coordenação]; Petroianu A, Aloise AC, Hochman B, et al [coeditores]. São Paulo: Red Publicações; 2017.

APÊNDICES

Apêndice 1. CEP UNIFESP

Aprovação Projeto Jovem Pesquisador Fapesp



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 2 de março de 2012
CEP Nº: 1918/11

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): MARIANA FERREIRA LEAL

Disciplina/Departamento: Traumatologia

Pesquisadores associados: Mariana Ferreira Leal, Moises Cohen (orientador), Marília de Arruda Cardoso Smith, Sintia Iole Nogueira Belangero, Andrea Kaly Ribeiro dos Santos, Sidney Emanuel Batista dos Santos

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

TÍTULO DO ESTUDO: Afeções ortopédicas não traumáticas de ombro: aspectos genéticos e moleculares :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção diagnóstica - estudo genético

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, envolvendo biopsia de tecidos.

OBJETIVO DO ESTUDO: O presente projeto busca identificar polimorfismos de genes envolvidos, principalmente, na estrutura e no remodelamento de matriz extracelular de tendão e cápsula associados ao risco de desenvolvimento de lesão do manguito rotador e capsulite adesiva. A expressão de genes envolvidos nesses processos será avaliada em amostras com e sem lesão do manguito rotador. Para elucidar os mecanismos envolvidos no controle transcricional, também serão avaliados o padrão e a frequência de metilação de DNA de alguns desses genes e a expressão de microRNAs nesses tecidos. São objetivos: 1. Comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos de genes envolvidos, principalmente, na estrutura e no remodelamento de matriz extracelular entre pacientes com lesão de manguito rotador ou capsulite adesiva e em indivíduos controles. 2. Comparar a expressão do RNAm dos genes de genes envolvidos, principalmente, na estrutura e no remodelamento de matriz extracelular entre amostras de tendão de manguito rotador com e sem lesão. 3. Comparar o padrão e a frequência de metilação do DNA dos genes de genes envolvidos, principalmente, na estrutura e no remodelamento de matriz extracelular entre amostras de tendão de manguito rotador com e sem lesão. 4. Comparar a expressão de microRNAs envolvidos no controle da expressão de genes envolvidos, principalmente, na estrutura e no remodelamento de matriz extracelular em amostras de manguito rotador com e sem lesão. 5. Correlacionar a expressão de RNAm, metilação de DNA, miRNA e polimorfismos de DNA. 6. Investigar a associação dos polimorfismos estudados, expressão de RNAm e miRNA, e padrão e frequência de metilação de DNA com variáveis clínicas, tais como gênero, idade, ancestralidade, tempo de acometimento da afeção, lesão total ou parcial do manguito rotador, variáveis ortopédicas e comorbidades clínicas. 7. Identificar os genes endógenos mais estáveis no tendão com ou sem lesão de manguito rotador para estudos de expressão do RNAm por qRT-PCR.

RESUMO: Para a análise de polimorfismo, serão avaliados 200 pacientes com lesão do manguito rotador e 200 pacientes com capsulite adesiva primária comprovadas por exame físico e de imagem (raio-X, ressonância magnética, artroscopia ou artroressonância) recrutados no serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital São Paulo, incluindo pacientes provenientes do Pronto-Socorro e dos Ambulatórios. Adicionalmente, como grupo controle, serão recrutados 400 indivíduos saudáveis (voluntários) sem nenhuma das afeções a serem estudadas, pareados por sexo, idade e ancestralidade. Para a análise de expressão do RNA mensageiro, miRNA e metilação de DNA, serão coletadas amostras de 50 pacientes com lesão de manguito rotador (incluídos no grupo de análise de polimorfismos), sendo 25 pacientes com ruptura total e 25 com ruptura parcial. Como a cirurgia para capsulite adesiva é pouco frequente, amostras de cápsula de pacientes com essa patologia serão coletadas para estudos posteriores com maior número amostral. Adicionalmente, serão coletadas amostras de tendão normal de 30 pacientes saudáveis submetidos à cirurgia devido a fraturas na região proximal do úmero para serem usadas como controles externos. Será realizada avaliação clínica e coleta de material biológico e extração de ácidos nucleicos. Para a análise de expressão de RNA, miRNA e metilação de DNA, serão coletadas amostras de 50 pacientes com ruptura de tendão supraespinhal (25 com ruptura total e 25 com ruptura parcial). De cada paciente, também serão coletadas amostras de tendão do manguito rotador sem lesão para serem usadas como controle pareado. Um segundo grupo controle será composto por amostras de tendão normal de 30 indivíduos submetidos a cirurgia devido a fraturas na porção proximal do úmero. As amostras de tendão serão armazenadas em Allprotect Tissue reagent (Qiagen, Alemanha), um reagente estabilizador de RNA e proteínas, por 24h em geladeira. Após esse período, serão estocadas em freezer a -80 °C até a extração de RNA e DNA. A outra amostra de cada indivíduo será fixada em formol 10% e emblocada em parafina para posterior análise histológica e/ou imunorreatividade de proteínas em futuros estudos. De cada indivíduo também serão coletados 10 mL de sangue periférico em tubo com EDTA para a extração de DNA. Adicionalmente, serão coletadas amostras de soro complementar para a formação de um banco de amostras de soro de indivíduos com lesão de manguito rotador ou capsulite adesiva, além de indivíduos controles, para futuros estudos de associação. Para estimar a proporção de diferentes ancestralidades global e individual, será avaliado um total de 62 polimorfismos de inserção/deleção (INDELs). Foram selecionados genes envolvidos, principalmente, na estrutura e remodelamento da matriz extracelular tais como FN1, TNC, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, TGFB1, TGFB1, KLF6, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, MMP13, MMP14, TIMP1, TIMP2 e TIMP3. Polimorfismos funcionais ou variantes previamente associados ao risco de lesões ortopédicas ou outras afeções serão avaliados. Genes com ilhas CpG na região promotora, serão selecionados para análise de metilação de DNA. Além de microRNAs envolvidos no silenciamento de genes envolvidos na estrutura e remodelamento de matriz extracelular.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

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

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo

TCLE: Adequado, contemplando a resolução 196/96

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 146543,61

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 48 meses

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

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

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

Atenciosamente,

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

APÊNDICE 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de consentimento livre e esclarecido

AFECÇÕES ORTOPÉDICAS NÃO TRAUMÁTICAS DE OMBRO: ASPECTOS GENÉTICOS E MOLECULARES

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

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

Será obtida amostra de sangue por punção periférica da veia do antebraço. A obtenção dessa amostra para a pesquisa não implicará riscos adicionais no seu tratamento, na sua consulta médica ou na sua cirurgia, nem aumento no tempo do exame ou da cirurgia. O desconforto será leve e poderá ocorrer devido ao próprio procedimento de coleta. Será utilizado material estéril e descartável.

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

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

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

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

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

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

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

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

Eu discuti com o Dr. _____

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

Nome do paciente

Assinatura do participante / representante legal

Data: ____/____/____

Assinatura da testemunha

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

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: ____/____/____

Registro da Disciplina de Genética: _____

Protocolo de Pesquisa – NIPE
QUESTIONÁRIO GERAL

Médico responsável: _____

Data da coleta: _____ Horário da coleta: _____ Local de coleta: _____

Nome do paciente: _____ Registro hospitalar: _____

Nome da mãe (em caso de coleta de tecido): _____

Sexo: Masculino Feminino Data de nascimento: _____

Endereço atual: _____

País: _____ Estado: _____ Cidade: _____

E-mail: _____ Telefone para contato: _____

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

Naturalidade: País: _____ Estado: _____ Cidade: _____

Local de nascimento da mãe: _____

Local de nascimento do pai: _____

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

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

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

Dominância: Braços: Destro Canhoto Ambidestro/ Pernas: Destro Canhoto Ambidestro**PROFISSÃO:**Atual: _____ Manual Não manualAnterior à lesão: Igual Outra: _____ Manual Não manual**ATIVIDADE FÍSICA/ESPORTE**Atividade física/esporte principal: Qual? _____ Atual Passado Frequência (por semana): _____

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

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

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

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

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

Observações (posição, nível, etc): _____

LESÃO DE ATUAL: Joelho Ombro TornozeloTipo: LCA Menisco Luxação patela* Tendinopatia do tendão de aquiles Osteoartrose Luxação ombro* Tendinite calcária do manguito rotador Lesão do manguito rotador Capsulite adesiva Outros _____* Primária Recidivante – N.º episódios: _____

Observações _____

Lado de acometimento: Direito Esquerdo Quando ocorreu? (tempo de lesão até coleta) _____Mecanismo de lesão: Traumático Não traumático Qual? _____Método de diagnóstico: Clínico Ressonância magnética Raios-X Ultrassom Artroscopia Artroressonância Tomografia Observações: _____

Tratamento: (indicar a duração e se foi concluído)

 Cirurgia: _____ Medicamentos: _____ Fisioterapia: _____ Outros: _____Realizou infiltrações pelo problema atual? Sim – N.º: _____ NãoAs infiltrações foram realizadas com qual medicamento? Não sabe Corticoide Anestésico local Outros _____

Quais são os sintomas atuais: Dor Inchaço Instabilidade Fraqueza
 Outro: _____

***Quais foram os sintomas no momento da lesão (se já iniciado tratamento):** Dor Inchaço
 Instabilidade Fraqueza Outro: _____

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

***Você praticava esportes na época da lesão (se já iniciado o tratamento):** Nenhum Limitado a exercícios sem carga Limitado, não no mesmo nível anterior à lesão Participa ativamente

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

Especificar _____ **lesões**
prévias: _____

Lado de acometimento: Direito Esquerdo
 Se _____ mais _____ que _____ uma _____ lesão,
 detalhar: _____

Quando _____
ocorreu? _____

Mecanismo de lesão: Traumático Não traumático
Qual? _____

Método de diagnóstico: Clínico Ressonância magnética Raio-X Ultrassom Artroscopia
 Artroressonância Tomografia

Observações: _____

Tratamento: (indicar a duração e se foi concluído)

Cirurgia: _____ Medicamentos: _____

Fisioterapia: _____ Outros: _____

COMORBIDADES CLÍNICAS:

Osteoartrose Contratura de Dupuytren Asma/bronquite Fibromialgia Acidente
 cerebrovascular Cardiopatia Hipertensão arterial sistêmica Marcapasso

Hipertrigliceridemia Dislipidemia

Litíase renal Insuficiência renal Hiperuricemia

Diabetes mellitus – Tipo 1 Tipo 2 Insulino-dependente Não insulino-dependente

Tireopatia – Hipertireoidismo Hipotireoidismo

Outra _____

Doenças autoimunes – Qual? _____

Tratamento: _____

Doenças psiquiátrica – Qual? _____

Tratamento: _____

Câncer – Qual? _____

Tratamento: _____

Doenças do tecido conectivo ou reumatológicas – Qual? _____
 Tratamento: _____

Outras/especificações: _____

HÁBITO TABAGISTA: Nunca fumou Parou Tabagista

Se sim: número de anos: _____ Frequência (cigarros/dia): _____

Se parou: Há quanto tempo parou de fumar? _____

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

USO DE MEDICAMENTOS CONTÍNUOS: Sim – Qual? _____
 Não

USO DE ANABOLIZANTES: Sim – Qual? _____
 Não

HEREDOGRAMA: (usar o verso do questionário)

Perguntar sobre lesões e comorbidades relacionadas. Símbolos cheios, mesma lesão que a atualmente apresentada pelo paciente / símbolos listrados: outras lesões de articulações (especificar).

Amostras:

Sangue (DNA – tubo tampa roxa) N.º tubos: ____ **Soro** (proteínas – tubo tampa amarela) N.º tubos: ____

Líquido sinovial (proteínas – tubo de tampa vermelha) N.º tubos: ____

Tecido estabilizante: Lesão _____ N.º tubos: ____ Normal _____ N.º tubos: ____

Tecido formol: Lesão _____ N.º tubos: ____ Normal _____ N.º tubos: ____

Observações: _____

Especificar tipo de tecido (ex. menisco, cápsula, tendão), localização (ex. lateral/medial), etc.

Apêndice 3. Questionário para pacientes com ombro congelado.



Registro da Disciplina de Genética: _____

Protocolo de Pesquisa – NIPE QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES COM CAPSULITE ADESIVA

Nome do paciente: _____

Registro

hospitalar: _____

Exame físico

Dor:

Lado direito: Sim Não Lado esquerdo: Sim Não

Escala visual de dor:

Sem dor 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Pior dor imaginável

Lado direito: _____ Lado esquerdo: _____

Amplitude do movimento:

a) Lado acometido

Elevação: _____ Rotação medial: _____ Rotação lateral: _____

b) Lado não acometido

Elevação: _____ Rotação medial: _____ Rotação lateral: _____

Tempo de doença

Quando teve capsulite adesiva? (mês/ano) _____

Quanto tempo de doença? (mês) _____ Quanto tempo tratou? (mês/ano) _____

O tratamento foi completo (tratamento seguiu toda orientação médica)? Sim Não

Antecedentes pessoais

Luxação do ombro Sim Não Não sabe/não avaliado Lado acometido: Direito Esquerdo

Bursite	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado	Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo
Fraturas	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado	Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo
Tendinite calcária	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado	Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo
Tendinopatia do bíceps	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado	Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo
Tendinopatia do antebraço	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado	Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo
Tendinopatia do manguito rotador	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado	Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo
Tendinopatia do bíceps	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado	Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo
Lesão (ruptura) do manguito rotador	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/não avaliado	Lado acometido: <input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> Esquerdo

ANEXOS

ANEXO 1: CURRENT CONCEPTS AND CONCERNS

Shoulder Stiffness

Current Concepts and Concerns

**Eiji Itoi · Guillermo Arce · Gregory I. Bain
Ronald L. Diercks · Dan Guttmann
Andreas B. Imhoff · Augustus D. Mazzocca
Hiroyuki Sugaya · Yon-Sik Yoo**
Editors



 **Springer**

Epidemiology of Frozen Shoulder

2

Carina Cohen and Benno Ejnisman

2.1 Introduction

As the etiology of frozen shoulder is not clearly understood, it is important to determine its epidemiology, so that specific risk factors, along with the interaction between them, and its prevalence can be identified. Strategies for intervention and prevention that take into account the underlying disease mechanisms should also be developed. The literature indicates that the incidence of idiopathic stiff shoulder or frozen shoulder is from 2 to 5 % in the general population [17]. Not only is it not uncommon, the associated annual health care and non-health care costs are estimated to be between \$7,000 and \$8,000 per episode [6, 40].

2.2 Epidemiology

Some authors have reported that the prevalence of frozen shoulder in women may reach 59–70 % [34, 38]. Other data have shown that it affects 3.38 women and 2.36 men per 1,000 person-years [43], or 2.4 people per 1,000 person-years for both sexes [41], mainly during middle age [15]. Our group performed a study in the Brazilian population, which is ethnically diverse, to identify the epidemiology. The

C. Cohen, MD (✉)
Sports Medicine Division, Orthopaedic Department,
Federal University of São Paulo, Avenida Lineu de Paula Machado,
660 – Jardim Everest, São Paulo, SP 05601-001, Brazil
e-mail: cacohen18@gmail.com

B. Ejnisman, MD, PhD
Sports Medicine Division, Orthopaedic Department,
Federal University of São Paulo, Avenida Lineu de Paula Machado,
660 – Jardim Everest, São Paulo, SP 05601-001, Brazil

Orthopaedic Department, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

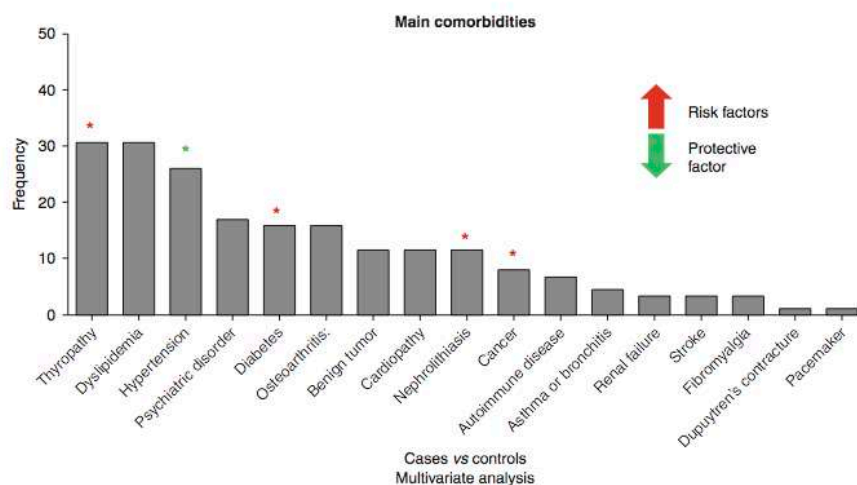


Fig. 2.1 The most common comorbidities found in patients with frozen shoulder. After a multivariate analysis, thyropathy, diabetes, nephrolithiasis, and cancer remained statistically significant, while hypertension was shown to be a protective factor

study included 88 frozen shoulder patients, of whom 52.3 % were female; the mean age at onset was 50.5 ± 8.4 years. There was a family history of the disease in 9.5 % of the patients, as determined by a heredogram.

Frozen shoulder often presents bilaterally, mainly in patients with diabetes, where its incidence varies between 10 and 41.7 % [4, 24], but it does not seem to affect the same shoulder twice [26]. In our study, we found bilateralism in 25.6 % of 88 patients, and 2 % of those represented a recurrence on one of the sides.

The most common comorbidities in our findings are shown in Fig. 2.1. They were present in 85 % of the patients with frozen shoulder, and 37.5 % had more than three comorbidities. After multivariate analysis, thyropathy, diabetes, nephrolithiasis, and cancer remained statistically significant, while, curiously, hypertension seemed to be a protective factor for frozen shoulder.

2.3 Thyropathy

In our data, we found individuals with thyropathy (hypothyroidism, nodules, Hashimoto's disease, Grave's disease, or thyroiditis) (Fig. 2.2) were 4 times more likely to develop frozen shoulder ($p < 0.001$) (Fig. 2.3); however, as the sample consisted of 88 frozen shoulder patients and 229 control patients, further studies should be performed to confirm this data.

Hypothyroidism is known to be risk factor for frozen shoulder. In one study of patients in an endocrinology clinic, frozen shoulder was present in 10.9 % of those with thyroid disorders, 8.8 % with Dupuytren's contracture, 9.5 % with carpal tunnel syndrome, 4.4 % with limited joint mobility, and 2.9 % with trigger

Fig. 2.2 Hypothyroidism represented 54 % of thyroid conditions associated with frozen shoulder

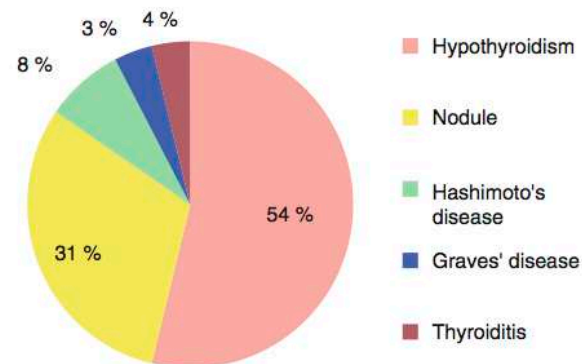
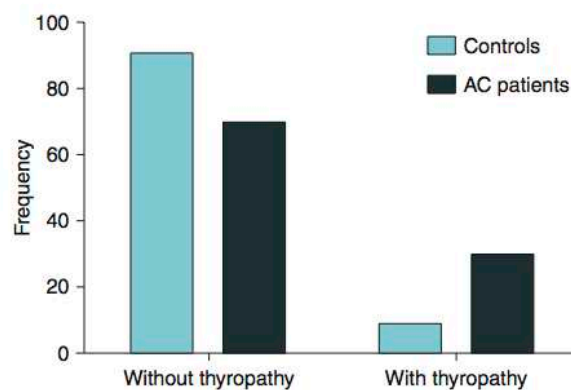


Fig. 2.3 Thyropathy shown as an independent risk factor [$p < 0.001$; ODDS = 4.37 (95 % CI: 2.01–9.52)] for developing frozen shoulder



finger [8]. Comparing the medical histories (diabetes, thyroid dysfunction, hypercholesterolemia, and hypertension), drug treatment, and blood tests of 126 frozen shoulder patients with an age-matched control group of 98 patients from an orthopedic foot and ankle clinic and to the regional population disease prevalence registry in Jerusalem, Milgrom et al. [26] concluded that thyroid diseases may be not only be a risk factor for musculoskeletal disorders in general but a specific risk factor for frozen shoulder in women. Bilateral presentation of frozen shoulder was statistically significant ($p = 0.014$) in the Brazilian population, with the presence of thyroid nodules in comparison to unilateral involvement.

2.4 Diabetes

The diabetic population has a higher incidence of frozen shoulder, between 10 and 36 %, which is 2–4 times greater than in the general population [33]. Insulin-dependent patients are at higher risk [12], and the mean age of onset of disease is younger than that in the general population. There seems to be less pain in frozen shoulder patients with diabetes, but the time course is longer because these patients show less response to treatment [27].

In our study comparing 88 frozen shoulder patients with 229 age- and sex-matched controls, we found diabetes to be an independent significant risk factor ($p=0.006$), showing almost 4 times the chance of developing the disease, which is in accordance with the study of Milgrom et al. that found 5 times the risk [5, 26].

Bridgman et al. studied 800 diabetic patients and 600 nondiabetic controls and found the incidence of frozen shoulder to be 10.8 and 2.3 %, respectively ($p<0.05$). An association was also found with severity of diabetes: 36 % of frozen shoulder patients were insulin-dependent, whereas only 23 % of the 800 diabetic patients investigated were insulin-dependent ($p<0.001$). Pal et al. [29] found the incidence of frozen shoulder to be 20.4 % of insulin-dependent patients, 18.3 % in non-insulin-dependent diabetic patients, and 5.3 % in the nondiabetic population.

In another study with 778 patients with diabetes [32], the incidence of frozen shoulder was 4.4 % in the diabetic patients, whereas the incidence in the control group was only 0.5 %. The low incidence in this study reflects the strict criteria used for frozen shoulder. The researchers found that 25.7 % of patients in the diabetes group complained of shoulder pain compared with only 5 % in the control group. A longer duration of diabetes was correlated with increased risk of frozen shoulder, although there was no relation with HbA1c levels. Insulin use was not found to be a risk factor.

2.5 Cancer

Cancer has also been pointed to as a risk factor for frozen shoulder. In our study, there was a history of tumor (malignant or benign) in 18.2 % of the frozen shoulder patients ($p=0.017$), mainly represented by breast cancer and breast tumor, thyroid cancer, and thyroid nodules (Fig. 2.4).

As survival after breast cancer treatment increases, morbidity in the upper extremity is more frequently seen. Shoulder pain after breast cancer treatment varies between 9 and 68 %, and restricted motion is present in 1–67 % of survivors [16, 36]. Breast cancer treatment is followed by moderately to greatly decreased shoulder flexion and abduction [5, 22].

Primary chest wall tumors may mimic the symptoms of frozen shoulder and may lead to misdiagnosis of the tumor in young patients [9].

2.6 Renal Failure

In patients undergoing long-term hemodialysis, findings of frozen shoulder, as rotator interval obliteration, with magnetic resonance imaging (MRI) correlates with the range limitation of shoulder motion [19]. In our study, renal failure was statistically significant ($p=0.002$) in patients with bilateral frozen shoulder in comparison to

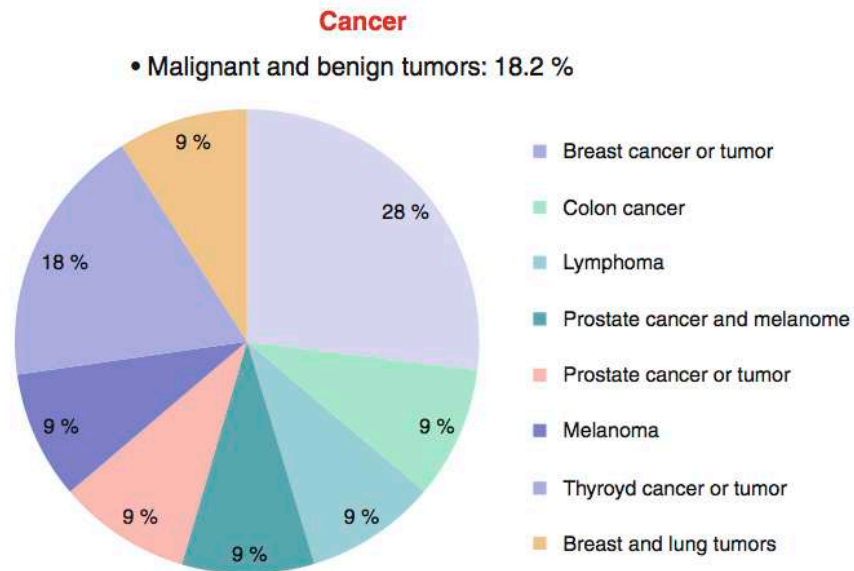


Fig. 2.4 Incidence of malignant and benign tumors in frozen shoulder patients in the Brazilian population, showing prevalence

unilateral presentation of the disease. This may correlate the severity of shoulder involvement with poor renal function, but whether there is an associated mechanism remains unknown.

2.7 Hypertension

A 2014 study showed that there is not a clear correlation between metabolic syndrome markers and frozen shoulder, but, for the first time, an association of hypertension with frozen shoulder resulting from a proinflammatory condition was described [2]. In contradiction, our data showed that hypertension was a protective factor for frozen shoulder ($p=0.02$; $ODDS=0.44$), perhaps because of increased blood flow or interactions among risk factors. Further studies are needed.

2.8 Parkinson's Disease

Parkinson's disease may also correlate with frozen shoulder. It was initially thought that the higher incidence was the result of immobility in later phases of the disease. However, in a study of 150 patients with Parkinson's disease and 60

controls, Riley et al. [32] showed that shoulder complaints were present in 43 % of those with Parkinson's disease versus 23 % of the controls. Diagnoses of frozen shoulder were made in 12.7 % of patients with Parkinson's disease and 1.7 % of the control group. The frozen shoulder group had initial symptoms indicative of akinesia twice as frequently as tremor, whereas the ratio was reversed in the control group. Curiously, in 8 % of the frozen shoulder group, frozen shoulder was the first symptom noted, 0–2 years prior to onset of Parkinson, suggesting a further relation between the two diseases beyond immobility.

2.9 Dupuytren's Disease

Dupuytren's disease is believed to have a strong correlation with frozen shoulder. Bunker et al. [7] reported that up to 60 % of patients with idiopathic frozen shoulder have a history of Dupuytren's disease. In addition, histological findings from samples of shoulder capsule are comparable to samples of from patients with Dupuytren's disease, showing increased local collagen production, myofibroblasts, and fibroplasia [35].

2.10 Genetics

While strong evidence exists that Dupuytren's disease has an inheritable component and a racial predilection, the same has not yet been shown in frozen shoulder [25]. A study of 865 monozygotic and 963 dizygotic twins found the prevalence of frozen shoulder to be 11.6 % and the rate of heritability to be 42 % [14].

Future research is needed to confirm whether specific genetic components or environmental factors are responsible. We believe there may be a genetic predisposition to developing frozen shoulder.

2.11 Other Risk Factors

Other risk factors are thought to contribute to the development of frozen shoulder, including ischemic heart disease, use of a pacemaker, stroke, depression and other psychiatric diseases, immobility, neck surgery, cardiac surgery, neurosurgery, smoking, low body mass index, and some medications, such as highly active antiretroviral therapy (HAART) with protease inhibitors for HIV [10, 13, 21], anti-convulsant drugs, and others [1, 11, 28, 39, 42].

A summary of the literature on factors associated with frozen shoulder is provided in Table 2.1.

Table 2.1 Summary of literature on factors associated with frozen shoulder

Associated factor	Incidence of association	Incidence of frozen shoulder	Risk ratio
Diabetes mellitus	29.4 % (Milgrom et al. [26])	0.65 % (Yian et al. 2012) to 10.8 % (Bridgman [5])	3.08 (1.23–4.98) (Lo et al. [23]) 5.9 for males (4.1–8.4) (Milgrom et al. [26]) 5.0 for females (3.3–7.5)
Hyperlipidemia			2.67 (2.36–4.06) (Lo et al. [23]) 1.789 (1.366–2.343) for hyper-cholesterolemia 1.643 (1.190–2.269) for measured hyper-low-density lipoproteinemia 1.645 (1.259–2.151) for hyper-non-high- density lipoprotein cholesterolemia (Sung et al. [37])
Thyroid disorders	13.5 % hypothyroidism	1.7 and 27 % in thyrotoxicosis (Baran [3]) 10.9 % in thyroid disorders group (Cakir et al. [8]) 13 % in hypothyroidism patients 10.8 % in subclinical thyrotoxic and thyrotoxic patients	7.3 (4.8–11.1) among females (Milgrom et al. [26]) 1.22 (1.03–1.45) (Huang et al. [18]) 5.33 (1.01–27.9) in hypothyroidism (Wang et al. [42]) 1.49 (1.25–1.77) in hyperthyroidism (Huang et al. [18])
BMI		Lower absolute body weight $p=0.011$ Lower body mass index $p=0.020$ (Wang et al. [42])	
Age			For each 5-year increment in age: Men: 1.14 (1.13–1.15) Women: 1.08 (1.07–1.08)
Sex		Women: 3.38 per 1,000 person-years Men: 2.36 per 1,000 person-years	1.27 (1.14–1.43) women > men (Yian 2012) 1.40 (1.38–1.43) women > men
Parkinson's disease		12.7 % (Riley et al. [32]) 19.8 % (Kim et al. [20]) 6 % (Rana et al. [30])	RR = 2.180 ($p=0.010$) (Kim et al. [20])
Family history			6.03 (2.43–10.50) (Wang et al. [42])
Ethnicity			2.25 (1.17–4.32) (Wang et al. [42])

Conclusion

In conclusion, the epidemiology of frozen shoulder is still not completely understood, and treatment results vary by study and population. There is some evidence that genetic factors may be associated with development of frozen shoulder, but little is known and further studies are needed.

References

1. Arkilla PET, Kantola IM, Viikari SA, Ronnemaa T. Shoulder capsulitis in type I and II diabetic patients: association with diabetic complications and related diseases. *Ann Rheum Dis.* 1996;55:907–14.
2. Austin DC, Gans I, Park MJ, Carey JL, Kelly JD. The association of metabolic syndrome markers with adhesive capsulitis. *J Shoulder Elbow Surg.* 2014;23(7):1043–51. doi:10.1016/j.jse.2013.11.004.
3. Baran, DT. The skeletal system in thyrotoxicosis. In: Werner and Ingbar's the Thyroid. eds Braverman LE, Utiger UD. Lippincott Williams, Philadelphia. 2000; pp. 659–66.
4. Blomqvist L, Stark B, Engler N, Malm M. Evaluation of arm and shoulder mobility and strength after modified radical mastectomy and radiotherapy. *Acta Oncol.* 2004;43(3):280–3.
5. Bridgman JF. Periarthritis of the shoulder and diabetes mellitus. *Ann Rheum Dis.* 1972;31:69–71.
6. Buchbinder R, Youd JM, Green S, Stein A, Forbes A, Harris A, et al. Efficacy and cost-effectiveness of physiotherapy following glenohumeral joint distension for adhesive capsulitis: a randomized trial. *Arthritis Rheum.* 2007;57:1027–37.
7. Bunker T, Anthony P. The pathology of frozen shoulder. A Dupuytren-like disease. *J Bone Joint Surg Br.* 1995;77(5):677.
8. Cakir M, Samanci N, Balci N, Balci MK. Musculoskeletal manifestations in patients with thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;59:162–7.
9. Demaziere A, Wiley AM. Primary chest tumor appearing as frozen shoulder. Review and case presentations. *J Rheumatol.* 1991;18(6):911–4.
10. de Witte S, Bonnet F, Bonarek M, Lamarque P, Morlat P, Receveur MC, et al. Adhesive capsulitis of the shoulder in an HIV patient treated with nelfinavir. *AIDS.* 2002;16:1307–8.
11. Eadington DW, Patrick AW, Frier CB. Limited joint mobility, Dupuytren's contracture and retinopathy in type 1 diabetes: association with cigarette smoking. *Diabet Med.* 1989;6:152–7.
12. Fisher L, Kurtz A, Shipley M. Association between cheiroarthropathy and frozen shoulder in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Br J Rheumatol.* 1986;25:141–6.
13. Graslan A, Ziza JM, Raguin G, Pouchot J, Vinceneux P. Adhesive capsulitis of shoulder and treatment with protease inhibitors in patients with human immunodeficiency virus infection. Report of 8 cases. *J Rheumatol.* 2000;27:2642–6.
14. Hakim AJ, Cherkas LF, Spector TD, MacGregor AJ. Genetic associations between frozen shoulder and tennis elbow: a female twin study. *Rheumatology.* 2003;42:739–42.
15. Hand C, Clipsham K, Rees JL, Carr AJ. Long-term outcome of frozen shoulder. *J Shoulder Elbow Surg.* 2008;17:231–6.
16. Hayes SC, Johansson K, Stout NL, et al. Upper-body morbidity after breast cancer: incidence and evidence for evaluation, prevention, and management within a prospective surveillance model of care. *Cancer.* 2012;118(8 suppl):2237–49.
17. Hsu JE, Anakwenze OA, Warrender WJ, Abboud JA. Current review of adhesive capsulitis. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011;20:502–14.

18. Huang SW, Lin JW, Wang WT, Wu CW, Liou TH, Lin HW. Hyperthyroidism is a Risk Factor for Developing Adhesive Capsulitis of the Shoulder: A Nationwide Longitudinal Population-Based Study. *Sci Rep*. 2014;4:4183. doi:010.1038/srep04183.
19. Kerimoglu U, Aydingoz U, Atay OA, Ergen FB, Kirkpantur A, Arici M. Magnetic resonance imaging of the rotator interval in patients on long-term hemodialysis: correlation with the range of shoulder motions. *J Comput Assist Tomogr*. 2007;31(6):970–5.
20. Kim YE, Lee WW, Yun JY, Yang HJ, Kim HJ, Jeon BS. Musculoskeletal problems in Parkinson's disease: neglected issues. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013;19(7):666–69. doi:10.1016/j.parkreldis.2013.03.002. Epub 2013 Apr 16. PMID: 23601512.
21. Léone J, Béguinot I, Dehlinger V, Jassaud R, Rouger C, Strady C, et al. Adhesive capsulitis of the shoulder induced by protease inhibitor therapy. Three new cases. *Rev Rhum Engl Ed*. 1998;12:800–1.
22. Levangie PK, Drouin J. Magnitude of late effects of breast cancer treatments on shoulder function: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;116(1):1–15.
23. Lo SF, Chu SW, Muo CH, Meng NH, Chou LW, Huang WC, Huang CM, Sung FC. Diabetes mellitus and accompanying hyperlipidemia are independent risk factors for adhesive capsulitis: a nationwide population-based cohort study (version 2). *Rheumatol Int*. 2014 Jan;34(1):67–74. doi:10.1007/s00296-013-2847-4. Epub 2013 Aug 15.
24. Mavrikakis ME, Sfikakis PP, Kontoyannis SA, Antoniadou LG, Kontoyannis DA, Mouloupoulou DS. Clinical and laboratory parameters in adult diabetics with and without calcific shoulder periarthritis. *Calcif Tissue Int*. 1991;49:288–91.
25. McFarlane RM. On the origin and spread of Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am*. 2002;27:385–90.
26. Milgrom C, Novack V, Weil Y, Jaber S, Radeva-Petrova DR, Finestone A. Risk factors for idiopathic frozen shoulder. *Isr Med Assoc J*. 2008;10:361–4.
27. Moren-Hybinette I, Moritz U, Schersten B. The clinical picture of the painful diabetic shoulder—natural history, social consequences and analysis of concomitant hand syndrome. *Acta Med Scand*. 1987;221(1):73–82.
28. Muhlhauser I. Smoking and diabetes. *Diabet Med*. 1990;7:10–5.
29. Pal B, Anderson J, Dick WC, Griffiths ID. Limitation of joint mobility and shoulder capsulitis in insulin and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Br J Rheumatol*. 1986;25:147–51.
30. Rana AQ, Khara M, Wasim M, Dogar T, Alenazi B, Qa'aty N. Screening for adhesive capsulitis in the timely diagnosis of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*. 2013;40(1):123–25. PMID: 23250143.
31. Reeves B. The natural history of the frozen shoulder syndrome. *Scand J Rheumatol*. 1975;4:193–6.
32. Riley D, Lang AE, Blair RD, Birnbaum A, Reid B. Frozen shoulder and other shoulder disturbances in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1989;52:63–6.
33. Sattar MA, Luqman WA. Periarthritis: another duration-related complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1985;8(5):507–10.
34. Sheridan MA, Hannafin JA. Upper extremity: emphasis on frozen shoulder. *Orthop Clin North Am*. 2006;37(4):531–9.
35. Smith SP, Devaraj VS, Bunker TD. The association between frozen shoulder and Dupuytren's disease. *J Shoulder Elbow Surg*. 2001;10:149–51.
36. Smoot B, Wong J, Cooper B, et al. Upper extremity impairments in women with or without lymphedema following breast cancer treatment. *J Cancer Surviv*. 2010;4:167–78.
37. Sung CM, Jung TS, Park HB. Are Serum Lipids Involved in Primary Frozen Shoulder? A Case-Control Study. *J Bone Joint Surg Am*, 2014;96(21):1828–33. <http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.M.00936>.

38. Thomas SJ, McDougall C, Brown ID, Jaberoo MC, Stearns A, Ashraf R, et al. Prevalence of symptoms and signs of shoulder problems in people with diabetes mellitus. *J Shoulder Elbow Surg.* 2007;16:748–51.
39. Tuten HR, Young DC, Douoguih WA, Lenhardt KM, Wilkerson JP, Adelaar RS. Adhesive capsulitis of the shoulder in male cardiac surgery patients. *Orthopaedics.* 2000;23(7):693–6.
40. Van den Hout WB, Vermeulen HM, Rozing PM, Vliet Vlieland TP. Impact of adhesive capsulitis and economic evaluation of high-grade and low-grade mobilisation techniques. *Aust J Physiother.* 2005;51:141–9.
41. Van der Windt DA, Koes BW, de Jong BA, Bouter LM. Shoulder disorders in general practice: incidence, patient characteristics, and management. *Ann Rheum Dis.* 1995;54:959–64.
42. Wang K, Ho V, Hunter-Smith DJ, Beh PS, Smith KM, Weber AB. Risk factors in idiopathic adhesive capsulitis: a case control study. *J Shoulder Elbow Surg.* 2013;22:24–9.
43. White D, Choi H, Peloquin C, Zhu Y, Zhang Y. Secular trend of adhesive capsulitis. *Arthritis Care Res.* 2011;63:1571–5.

ANEXO 2: ARTIGO



CLINICAL SCIENCE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

¹¹contributed equally to this work

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

No potential conflict of interest was reported.

DOI: 10.6061/clinics/2016(06)07



key mediator of the fibrotic response (6). TGF β is activated by proteolytic cleavage (7) mediated by the signaling receptors TGF β receptor I (TGF β R1) and TGF β receptor 2 (TGF β R2) (8). TGF β R1 is the principal propagator of TGF β signaling (9).

TGF β 1, a key member of the TGF β superfamily, regulates the collagen-modifying enzymes lysyl oxidase (LOX) (10) and lysyl hydroxylases 1 and 2 (encoded by the *PLOD1* and *PLOD2* genes, respectively) (11-13). LOX plays a role in connective tissue matrix biogenesis through the oxidation of lysine residues in collagen and elastin, contributing to the formation of covalent cross-links and thereby stabilizing fibrous ECM proteins (14,15). In several fibrotic injuries, TGF β 1 controls the expression and enzymatic activity of LOX (10).

Lysyl hydroxylases such as *PLOD1* and *PLOD2* promote cross-linking in ECM molecules, which contribute to ECM structural stability and maturation (16,17). Increased *PLOD2* expression has been reported in fibroblasts isolated from hypertrophic scars, keloids and *palmar fascia* from patients with Dupuytren disease (18). To the best of our knowledge, no previous studies have evaluated the roles of lysyl oxidase and hydroxylase in adhesive capsulitis.

TGF β regulates and is regulated by several ECM proteins. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP), a glycoprotein found in the ECM of joints, plays a catalytic role in fibrillogenesis (19). Recent studies have shown that COMP also directly binds members of the TGF β superfamily of proteins, including TGF β 1 (20). Haudenschild et al. showed that TGF β 1 displays enhanced bioactivity when bound to COMP (20). In addition, TGF β 1 appears to have the capacity to induce COMP expression (21).

Fibronectin (FN), a glycoprotein encoded by the *FNI* gene, is involved in several biological processes, including cell adhesion, tissue development and wound healing (22). FN also has a role in TGF β regulation (23). Moreover, FN expression increases under stimuli induced by TGF β (24).

Moreover, the tenascins (TN), including TNR, TNC and TNX, are a highly conserved family of ECM glycoproteins. TNR is expressed only in the brain, whereas TNC and TNX are expressed in several organs and tissues, including in the joints (25). TNC has an important role in modulating the actions of TGF β (26) and is also regulated by TGF β (27). TNXB seems to regulate collagen synthesis or deposition (28). A recent study showed that TNX also regulates TGF β bioavailability and modulates cell plasticity (29).

In the present study, we quantified the mRNA expression of the *TGF β 1*, *TGF β R1*, *LOX*, *PLOD1*, *PLOD2*, *COMP*, *FNI*, *TNC* and *TNXB* genes in glenohumeral synovium/capsule samples collected from patients with adhesive capsulitis and from controls. We also evaluated how these mRNA levels are associated with clinical features.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The current study used a case-control study design (level 3 evidence). All patients and controls were treated at the Hospital São Paulo of the Universidade Federal de São Paulo. Each patient agreed to participate by signing a written consent form before data and sample collection. This study was approved by the ethics committee of the Universidade Federal de São Paulo (approval number: CEP 1918/11).

The case group was composed of 9 patients with idiopathic adhesive capsulitis of the shoulder in freezing or

frozen stages who were diagnosed by clinical evaluation. During the clinical evaluations, the patients presented with pain, loss of motion and severe limitations during daily activities; no history of trauma or previous shoulder pathologies; and functional restriction of both active and passive shoulder motion. Magnetic resonance imaging (MRI) was used to exclude secondary stiff shoulder. The patients underwent arthroscopic shoulder capsular release after a concerted effort was made to treat them with conservative management for at least 5 complete months. In all cases, the physiotherapy had failed. Additionally, patients meeting the following exclusion criteria were omitted: generalized arthritis; previous compromise of the shoulder, such as major trauma, fracture, rotator cuff tear, calcifying tendinitis, or shoulder instability; and superior labral anterior and posterior (SLAP) lesions. Additionally, patients who did not agree with the informed consent terms were excluded. All enrolled patients underwent an arthroscopic procedure.

The control group consisted of 8 physically active subjects who underwent arthroscopically assisted treatment for acute acromioclavicular dislocation. None of the controls presented with a history of adhesive capsulitis. Moreover, radiological indication of glenohumeral capsule alteration was detected. A standard complete joint evaluation by arthroscopy confirmed that the controls did not present any other concomitant pathology in the shoulder.

All patients answered a preoperative questionnaire concerning gender, age at surgery, age of pain onset, duration of symptoms, bilaterality, suprascapular nerve block, physical activity, type of work and smoking habits (Table 1).

Tissue samples

Tissue samples of approximately 2 mm³ were obtained from the anterior-inferior portion of the glenohumeral capsule during the arthroscopic procedure. To reduce sampling variation, only two of the authors (CC and BE) were responsible for collecting the tissue samples. The samples were collected as previously described (30-32). As the synovium is adhered to the capsule, it cannot be separated from the capsule using arthroscopic instruments.

Table 1 - Distribution of clinical variables for patients with adhesive capsulitis.

Variable	Distribution
Age at surgery, years [median (IQR)]	51.7 (16.5)
Age at symptom onset, years [median (IQR)]	50.4 (14.5)
Gender [N(%)]	
Male	3 (33)
Female	6 (67)
Duration of condition, months [median (IQR)]	10.67 (10)
Bilaterality [N(%)]	
No	6 (67)
Yes	3 (33)
Practice of sports involving the upper limbs [N (%)]	
No	8 (89)
Yes	1 (11)
Type of job [N(%)]	
Non-manual	6 (67)
Manual	3 (33)
Smoking habits [N(%)]	
Non-smoker	8 (89)
Smoker	1 (11)

N: number of patients; IQR: interquartile range.

**Table 2** - Summary of reference gene and target gene assays.

Gene symbol	Name	Assay*
<i>TGFR1</i>	Transforming growth factor, beta 1	Hs00998133_m1
<i>TGFB1</i>	Transforming growth factor, beta receptor 1	Hs00610320_m1
<i>LOX</i>	Lysyl oxidase	Hs00942480_m1
<i>PLOD1</i>	Lysyl hydroxylases 1	Hs00609368_m1
<i>PLOD2</i>	Lysyl hydroxylases 2	Hs01118190_m1
<i>COMP</i>	Cartilage oligomeric matrix protein	Hs00164359_m1
<i>FN1</i>	Fibronectin 1	Hs00365052_m1
<i>TNC</i>	Tenascin C	Hs01115665_m1
<i>TNXB</i>	Tenascin XB	Hs00372889_g1
<i>B2M**</i>	Beta-2-microglobulin	Hs00984230_m1
<i>HPRT1**</i>	Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase	Hs02800695_m1

* TaqMan probes were purchased as assay-on-demand products for gene expression (Life Technologies, USA).

** Reference genes for target gene expression normalization.

Table 3 - Gene expression patterns in the glenohumeral capsules of patients with adhesive capsulitis and in controls.

Gene	Cases [Δ Crt: Median (IQR)]	Controls [Δ Crt: Median (IQR)]	p-value
<i>TGFR1</i>	0.99 (0.62)	0.57 (0.52)	0.149
<i>TGFB1</i>	1.77 (1.04)	1.47 (0.73)	0.923
<i>LOX</i>	3.16 (2.27)	3.37 (1.52)	0.700
<i>PLOD1</i>	0.95 (0.62)	1.07 (0.48)	0.336
<i>PLOD2</i>	2.39 (0.82)	3.11 (1.08)	0.068
<i>COMP</i>	1.39 (3.53)	-0.01 (2.05)	0.336
<i>FN1</i>	-5.65 (1.53)	-4.85 (0.79)	0.043*
<i>TNC</i>	-1.48 (1.72)	0.36 (1.31)	0.005*
<i>TNXB</i>	-2.55 (1.02)	-2.79 (1.03)	0.290

* Significant difference between groups by Mann-Whitney test ($p < 0.05$). IQR: interquartile range. A lower delta cycle threshold value (Δ Crt) indicates higher gene expression.

To provide immediate stabilization of RNA, all synovium/capsule specimens were instantly preserved in Allprotect Tissue Reagent[®] (Qiagen, Germany) and then stored at -20 °C.

RNA extraction

An AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen, Germany) was used to purify total RNA from the synovium/capsule specimens. Tissue Lyser LT equipment (Qiagen, USA) was used to mechanically lyse the tissue samples. A NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) was used to determine RNA concentration and quality. RNA integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis. The RNA samples were stored at -80 °C.

mRNA expression analysis

Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to evaluate mRNA expression. First, a High-Capacity cDNA Archive kit (Life Technologies, USA) was used for cDNA synthesis. Then, RT-qPCR was performed as previously described using a ViiA 7 Real-Time PCR System (Life Technologies, USA) (30). To exclude technical variations, target and reference genes (Table 2) were analyzed on the same TaqMan Low-Density Array (TLDA) cards (Life Technologies, USA). All qPCR assays were performed in triplicate. The *B2M* and *HPRT1* genes were used as reference genes to normalize sample input amount. These genes were chosen based on a previous study of suitable internal controls for the evaluation of mRNA expression in shoulder capsule samples (33).

The relative cycle threshold method (Crt method) was used to quantify mRNA expression. In this method, the lower the cycle threshold value (Crt) value, the greater the number of initial target copies in the sample. Thus, low Crt values indicate high gene expression. The expression of the target genes was determined using the following equation: Δ Crt=target gene Crt - the mean of the reference genes Crt.

Statistical analysis

All Δ Crt values are shown as the median with the interquartile range (IQR).

The gender and age distributions between the patients with adhesive capsulitis and the controls were compared using the Chi-square test and the Mann-Whitney test, respectively. The Mann-Whitney test was also applied to compare mRNA levels between the cases and the controls, as well as to investigate the possible associations between mRNA expression and preoperative clinical variables, such as gender, practice of sports involving the upper limbs, type of job (manual *versus* non-manual job) and smoking habits. Spearman's correlation was used to assess possible correlations between mRNA levels and duration of symptoms or age at surgery: a value below 0.40 was considered a weak correlation, a value between 0.40 and 0.59 was considered a moderate correlation, a value between 0.6 and 0.79 was considered a strong correlation and a value ≥ 0.80 was considered a very strong correlation. For all analyses, a p -value < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using PASW (SPSS) software, version 18 (SPSS Inc., Chicago, USA).



RESULTS

Differences between cases and controls

Table 1 presents the clinical variables of the study participants. In the control group, 1 (12.5%) individual was female and 7 (87.5%) were males. The median age at the time of surgery was 31.44 years (IQR=13.5). The gender distribution did not differ between the study groups ($p=0.05$). However, the controls were significantly younger than the patients with adhesive capsulitis ($p=0.012$, Mann-Whitney test).

Table 3 shows the median and IQR values for the expression levels of the studied genes in the samples from the patients and the controls. The patients with adhesive capsulitis had higher levels of *TNC* ($p=0.005$; Figure 1A) and *FNI* ($p=0.043$; Figure 1B) expression compared to the controls. No other significant differences were observed between the patients and the controls ($p>0.05$).

Associations between the clinical characteristics of adhesive capsulitis and mRNA expression

Figure 2 shows the correlations between the duration of adhesive capsulitis symptoms and the expression levels of the studied genes. In the tissue samples, the expression of *TGFβ1* mRNA was significantly and directly correlated with the duration of symptoms ($r=0.731$, $p=0.025$; Figure 2B).

No correlation was found between the age of the patients at the time of surgery and the age at symptom onset ($p>0.05$). Additionally, no association was found between the mRNA levels of the studied genes and any of the clinical features assessed in the patients with adhesive capsulitis ($p>0.05$).

DISCUSSION

Although adhesive capsulitis is considered a self-limited disease, some patients show little to no improvement, maintain a limited range of motion and continue to experience shoulder pain. Non-operative treatment is the initial approach used for adhesive capsulitis. However, operative treatment (such as arthroscopic capsular release) may be considered when patients remain in pain and do not regain satisfactory range of motion after prolonged non-operative treatment (34,35).

In this study, we found higher levels of *TNC* and *FNI* expression in glenohumeral synovium/capsule samples collected from patients with adhesive capsulitis compared to those collected from controls. *TNC* immunoreactivity was previously reported in other shoulder diseases, including in

rotator cuff tendon tears and in the subacromial bursa of patients with impingement syndrome (36,37). In addition, we have previously found that both *TNC* and *FNI* mRNA levels were upregulated in the glenohumeral capsules of patients with traumatic anterior shoulder instability (unpublished data). *TNC* is a large hexameric ECM glycoprotein that has roles in cell adhesion, fibroblast migration and other processes related to tissue remodeling and wound healing (38,39). *TNC* is specifically expressed following tissue damage, being upregulated within 24 h of injury (38). It is activated after local injury and down-regulated after tissue repair or scarring is completed (40). Persistent expression of *TNC* is associated with several fibrotic diseases and with chronic non-healing wounds (38).

Therefore, we hypothesize that increased *TNC* expression may be a marker of capsule injury and the genes involved may participate in inflammatory and fibrotic processes in the glenohumeral capsule.

FN is essential for collagen fibril assembly (41). During the early phase of wound healing, *FN* is deposited at sites of injury and can induce inflammation; increase ECM deposition, including of *FN* and collagen; and activate fibroblasts. These pathways can create a vicious cycle that eventually induces keloid formation or fibrosis (42). Additionally, *FN* has been previously associated with Dupuytren's contracture (24). In this disease, *FN* can be found in its oncofetal form (43,44). Additionally, upregulation of *FNI* has been associated with fibrosis in inflammatory orbital diseases (45), hepatic fibrosis (46), idiopathic pulmonary fibrosis (47,48) and liver fibrosis (49). These relationships indicate that this molecule may also be involved in the pathogenesis of other fibrosing diseases. Interestingly, Altrock et al. showed that blocking *FN* deposition using an *FN* assembly inhibitor (pUR4) resulted in decreased collagen accumulation and improved liver function during liver fibrogenesis (50). Although only a slight increase in *FNI* expression was detected in the glenohumeral capsules of the patients with adhesive capsulitis in the current study, our results suggest that *FNI* may play a role in the fibrotic process. Further investigation is still necessary to understand the dynamic transcriptional regulation of *FNI* that occurs within the shoulder capsule.

We also observed that the expression of *TGFβ1* mRNA in the capsule was directly correlated with symptom duration in the patients with adhesive capsulitis. To the best of our knowledge, only one previous study has evaluated the role of the *TGFβ* receptor in adhesive capsulitis (5). Rodeo et al. analyzed both *TGFβ* and its receptor in capsule and synovium samples collected from patients with adhesive capsulitis and in those collected from controls (5). They

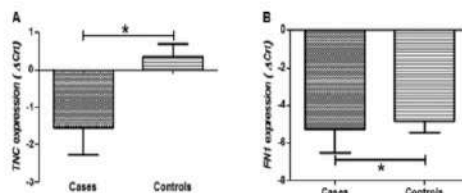


Figure 1 - *TNC* (A) and *FNI* (B) expression levels in capsule samples collected from patients with adhesive capsulitis and controls. A lower delta cycle threshold value (ΔCt) indicates higher gene expression. Box plots show the median and interquartile range. *A significant difference between groups by Mann-Whitney test ($p<0.05$).

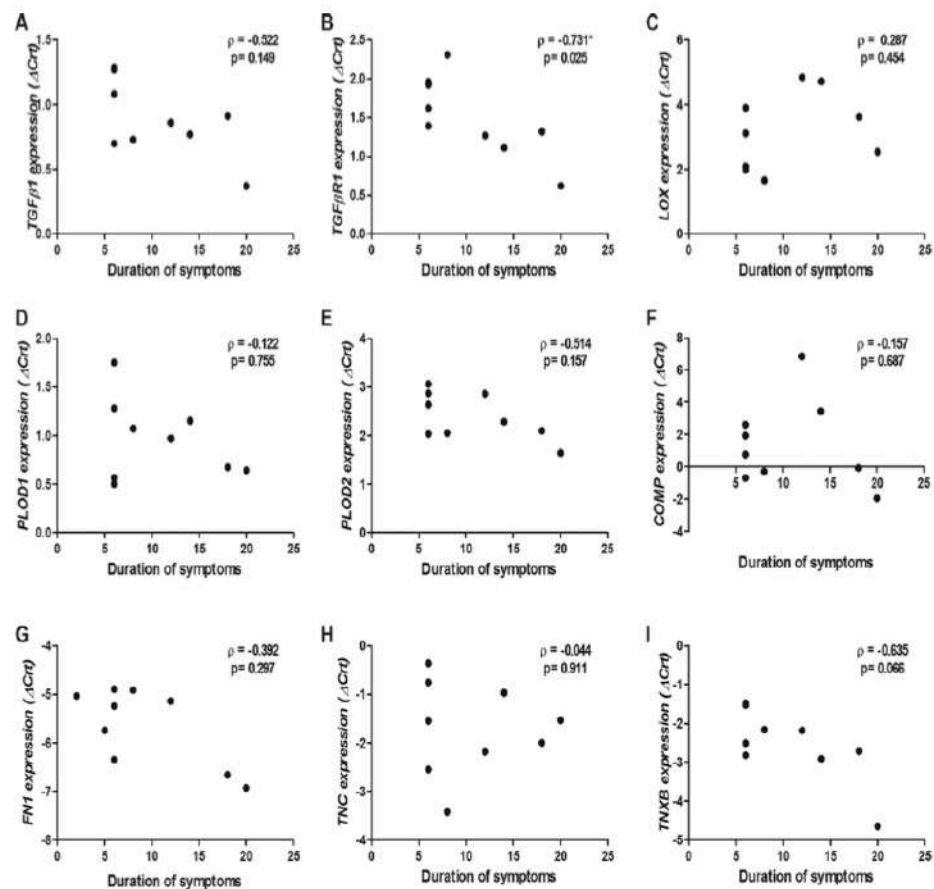


Figure 2 - Correlation between gene expression and duration of adhesive capsulitis (months). A) *TGFβ1*; B) *TGFβR1*; C) *LOX*; D) *PLOD1*; E) *PLOD2*; F) *COMP*; G) *FN1*; H) *TNC*; and I) *TNXB*. ρ : Spearman correlation coefficient (*rho*). *Significant correlation ($p < 0.05$). A lower delta cycle threshold value (ΔCt) indicates higher gene expression.

performed a semi-quantitative analysis by comparing the frequency of positive staining between the groups. The authors described that the synovial and capsular cells of patients with adhesive capsulitis and synovitis showed clear TGFβ and TGFβR staining, whereas no or minimal staining was observed in the normal tissue specimens. The blood vessels of the affected tissues also presented staining for both proteins. Moreover, there was a higher frequency of positive TGFβ and TGFβR staining in the synovial cells of the patients with adhesive capsulitis. In addition, there was a greater frequency of positive TGFβ staining in the ECMs of patients with adhesive capsulitis compared to the controls, particularly in the capsule tissue.

In the present study, we found no differences in the expression of *TGFβ1* and *TGFβR1* mRNA between the cases and the controls. Because the synovium is adhered to the capsule and cannot be separated from the capsule using arthroscopic instruments, our investigation did not discriminate between gene expression in synovial and capsular tissues. However, molecular alterations in both tissues are important in adhesive capsulitis (51). In addition, our study is the first to use a quantitative approach to evaluate the role of *TGFβR1* in adhesive capsulitis. Our results suggest that

TGFβR1 may have a role in adhesive capsulitis, especially in the long-term disease.

To the best of our knowledge, this study is the first to quantify *TGFβ1*, *TGFβR1*, *LOX*, *PLOD1*, *PLOD2*, *COMP*, *FN1*, *TNC* and *TNXB* mRNA expression in the shoulder capsules of patients with adhesive capsulitis. However, this study has some limitations. First, few patients with adhesive capsulitis are surgically treated; as such, there is a limited number of tissue samples available for studies of gene expression (5,35,52-59). Therefore, some of our statistical analyses had reduced power to detect significant differences between the studied groups and false-negative results may have occurred. Second, we included patients who failed in conservative treatment in different phases of frozen shoulder, some in freezing and others in frozen stages. This heterogeneity may have also contributed to false negatives. Third, molecular alterations may occur in other capsule regions and may have a different etiological role in capsular injury (30-32). We evaluated the AI region because this portion of the capsule presented macroscopic injuries (i.e., a high level of inflammation) during arthroscopic examination of the studied patients. Although we did not detect a correlation between age and gene expression in the tissue samples

Gene expression in adhesive capsulitis
Cohen C et al.



CLINICS 2016;71(6):325-331

collected from the patients with adhesive capsulitis, it is important to highlight that the age distribution between the patients and the controls was different. Thus, we cannot exclude that age might have influenced our findings. Finally, additional analysis of the protein products of the studied genes may be interesting because protein function is also affected by post-transcriptional and post-translational regulation.

Elevated expression of *TNC* and *FNI* mRNA may be a marker of capsule injury and may be involved in capsule inflammation and fibrosis. Upregulation of *TGF β 1* seems to be related to symptom duration in adhesive capsulitis; therefore, TGF β signaling may play a role in this condition.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants and fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ; MC and MACS) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; MC and MFL). We are grateful to Sintia Iole Belangero, Ph. D, for the scientific project support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Cohen C, Leal MF, Smith MC, Ejnisman B and Faloppa F conceived and designed the experiments. Cohen C, Belangero PS, Figueiredo EA, Andreoli CV, Pochini AC and Ejnisman B were involved in data collection. Cohen C, Belangero PS, Figueiredo EA, Figueiredo EA, Pochini AC and Ejnisman B were responsible for sample collection. Leal MF was involved in the genetic analysis. Cohen C, Leal MF, Belangero PS and Figueiredo EA performed the literature search. Leal MF and Smith MC were involved in data and statistical analyses. Cohen C and Leal MF wrote the first draft of the manuscript. All authors listed have contributed to all subsequent drafts and all have approved the final manuscript.

REFERENCES

- Marske RC, Prohaska D. Diagnosis and management of adhesive capsulitis. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2008;1(3-4):180-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s12178-008-9031-6>.
- Tamai K, Akutsu M, Yano Y. Primary frozen shoulder: brief review of pathology and imaging abnormalities. *J Orthop Sci*. 2014;19(1):1-5. <http://dx.doi.org/10.1007/s00776-013-0495-x>.
- Hand GC, Athanasou NA, Matthews T, Carr AJ. The pathology of frozen shoulder. *J Bone Joint Surg Br*. 2007;89(7):928-32. <http://dx.doi.org/10.1302/0301-620X.89B7.19097>.
- Bunker ID, Anthony PP. The pathology of frozen shoulder. A Dupuytren-like disease. *J Bone Joint Surg Br*. 1995;77(5):677-83.
- Rodeo SA, Hannafin JA, Tom J, Warren RF, Wickiewicz TL. Immunolocalization of cytokines and their receptors in adhesive capsulitis of the shoulder. *J Orthop Res*. 1997;15(3):427-36. <http://dx.doi.org/10.1002/jor.1100150316>.
- LeRoy EC, Trojanowska M, Smith EA. Cytokines and human fibrosis. *Eur Cytokine Netw*. 1990;1(4):215-9.
- Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol*. 1998;30(3):293-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00128-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00128-3).
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 1994;370(6488):341-7. <http://dx.doi.org/10.1038/370341a0>.
- Moore-Smith L, Pasche B. TGF β 1 signaling and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011;16(2):89-95. <http://dx.doi.org/10.1007/s10911-011-9216-2>.
- Yoshida M, Fujii K. Differences in cellular properties and responses to growth factors between human ACL and MCL cells. *J Orthop Sci*. 1999;4(4):293-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s007760050106>.
- Knippenberg M, Helder MN, Doulabi BZ, Bank RA, Wuisman PJ, Klein-Nulend J. Differential effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on gene expression of collagen-modifying enzymes in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

- Tissue Eng Part A*. 2009;15(8):2213-25. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0184>.
- Remst DF, Blaney Davidson EN, Vitters EL, Bank RA, van den Berg WB, van der Kraan PM. TGF- β induces Lysyl hydroxylase 2b in human synovial osteoarthritic fibroblasts through ALK5 signaling. *Cell Tissue Res*. 2014;355(1):163-71. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-013-1740-5>.
- Witsch TJ, Turowski P, Sakkas E, Niess G, Becker S, Herold S, et al. Deregulation of the lysyl hydroxylase matrix cross-linking system in experimental and clinical bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306(3):L246-59. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00109.2013>.
- Smith-Mungo LJ, Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol*. 1998;16(7):387-98. [http://dx.doi.org/10.1016/S0945-053X\(98\)90012-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0945-053X(98)90012-9).
- Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem*. 2003;88(4):660-72. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.10413>.
- Myllyla R, Wang C, Heikkinen J, Juffer A, Lampela O, Risteli M, et al. Expanding the lysyl hydroxylase toolbox: new insights into the localization and activities of lysyl hydroxylase 3 (LH3). *J Cell Physiol*. 2007;212(2):323-9. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21036>.
- Eyre DR, Koob TJ, Van Ness KP. Quantitation of hydroxyproline crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1984;137(2):380-8. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697.1984.137\(2\):380-8](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697.1984.137(2):380-8).
- van der Slot AJ, Zuurmond AM, van den Bogaerd AJ, Ulrich MM, Middeldorp E, Boers W, et al. Increased formation of pyridinoline crosslinks due to higher telopeptide lysyl hydroxylase levels is a general fibrotic phenomenon. *Matrix Biol*. 2004;23(4):251-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2004.06.001>.
- Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M, Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J Biol Chem*. 1998;273(32):20397-403. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.32.20397>.
- Haudenschild DR, Hong E, Yik JH, Chromy B, Morgelin M, Snow KD, et al. Enhanced activity of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) bound to cartilage oligomeric matrix protein. *J Biol Chem*. 2011;286(50):43250-8. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.234716>.
- Farina G, Lemaire R, Korn JH, Widom RL. Cartilage oligomeric matrix protein is overexpressed by scleroderma dermal fibroblasts. *Matrix Biol*. 2006;25(4):213-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2006.01.007>.
- Vakonakis I, Campbell ID. Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(5):578-83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cob.2007.09.005>.
- Dallas SL, Sivakumar P, Jones CJ, Chen Q, Peters DM, Mosher DF, et al. Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1. *J Biol Chem*. 2005;280(19):18871-80. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M410762200>.
- Cordova A, Tripoli M, Corradino B, Napoli P, Moschella F. Dupuytren's contracture: an update of biomolecular aspects and therapeutic perspectives. *J Hand Surg Br*. 2005;30(6):557-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhbs.2005.07.002>.
- Zweers MC, Hakim AJ, Grahame R, Schalkwijk J. Joint hypermobility syndromes: the pathophysiologic role of tenascin-X gene defects. *Arthritis Rheum*. 2004;50(9):2742-9. <http://dx.doi.org/10.1002/art.20488>.
- Carey WA, Taylor GD, Dean WB, Bristow JD. Tenascin-C deficiency attenuates TGF- β -mediated fibrosis following murine lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;299(6):L785-93. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00385.2009>.
- Chiquet-Ehrismann K, Tucker RP. Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(5). <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a004960>.
- Mao JR, Taylor G, Dean WB, Wagner DR, Afzal V, Lotz JC, et al. Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nat Genet*. 2002;30(4):421-5. <http://dx.doi.org/10.1038/ng850>.
- Valkoort U, Alcaraz LB, Exposito JY, Lethias C, Bartholin L. Tenascin-X: beyond the architectural function. *Cell Adh Migr*. 2015;9(1-2):154-65. <http://dx.doi.org/10.4161/19336918.2014.994893>.
- Belangero PS, Leal MF, Cohen C, Figueiredo EA, Smith MC, Andreoli CV, et al. Expression analysis of genes involved in collagen cross-linking and its regulation in traumatic anterior shoulder instability. *J Orthop Res*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/jor.22984>.
- Belangero PS, Leal MF, de Castro Pochini A, Andreoli CV, Ejnisman B, Cohen M. Profile of collagen gene expression in the glenohumeral capsule of patients with traumatic anterior instability of the shoulder. *Rev Bras Ortop*. 2014;49(6):642-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2013.10.012>.
- Belangero PS, Leal MF, Figueiredo EA, Cohen C, Pochini Ade C, Smith MC, et al. Gene expression analysis in patients with traumatic anterior shoulder instability suggests deregulation of collagen genes. *J Orthop Res*. 2014;32(10):1311-6. <http://dx.doi.org/10.1002/jor.22680>.
- Leal MF, Belangero PS, Cohen C, Figueiredo EA, Loyola LC, Pochini AC, et al. Identification of suitable reference genes for gene expression studies



- of shoulder instability. *PLoS One*. 2014;9(8):e105002. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0105002>.
34. Holloway GB, Schenk T, Williams CR, Ramsey ML, Jannotti JP. Arthroscopic capsular release for the treatment of refractory postoperative or post-fracture shoulder stiffness. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A(11):1682-7.
 35. Hagiwara Y, Ando A, Onoda Y, Takemura T, Minowa T, Hanagata N, et al. Coexistence of fibrotic and chondrogenic process in the capsule of idiopathic frozen shoulders. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(3):241-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2011.12.008>.
 36. Riley GP, Harrall RL, Cawston TE, Hazleman BL, Mackie EJ. Tenascin-C and human tendon degeneration. *Am J Pathol*. 1996;149(3):933-43.
 37. Hyvonen P, Melkko J, Lehto VP, Jalovaara P. Involvement of the sub-acromial bursa in impingement syndrome of the shoulder as judged by expression of tenascin-C and histopathology. *J Bone Joint Surg Br*. 2003;85(2):299-305. <http://dx.doi.org/10.1302/0301-620X.85B2.13124>.
 38. Trebaul A, Chan EK, Midwood KS. Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 4):695-7. <http://dx.doi.org/10.1042/BST0350695>.
 39. Snyder JC, Zemke AC, Stripp BR. Reparative capacity of airway epithelium impacts deposition and remodeling of extracellular matrix. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;40(6):633-42. <http://dx.doi.org/10.1165/rmb.2008-0334CC>.
 40. Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal*. 2009;3(3-4):287-310. <http://dx.doi.org/10.1007/s12079-009-0075-1>.
 41. Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(5):495-501. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cob.2008.06.008>.
 42. Kelsch RM, McKeown-Longo PJ, Clark RA. EDA Fibronectin in Keloids Create a Vicious Cycle of Fibrotic Tumor Formation. *J Invest Dermatol*. 2015;135(7):1714-8. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2015.155>.
 43. Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261(9):4337-45.
 44. Howard JC, Varallo VM, Ross DC, Faber KJ, Roth JH, Seney S, et al. Wound healing-associated proteins Hsp47 and fibronectin are elevated in Dupuytren's contracture. *J Surg Res*. 2004;117(2):232-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2004.01.013>.
 45. Rosenbaum JT, Choi D, Wilson DJ, Grossniklaus HE, Harrington CA, Dailey RA, et al. Fibrosis, gene expression and orbital inflammatory disease. *Br J Ophthalmol*. 2015;99(10):1424-9. <http://dx.doi.org/10.1136/bjophthalmol-2015-306614>.
 46. Modol T, Brice N, Ruiz de Galarreta M, Garcia Garzon A, Iraburu MJ, Martinez-Rujo JJ, et al. Fibronectin peptides as potential regulators of hepatic fibrosis through apoptosis of hepatic stellate cells. *Journal of cellular physiology*. 2015;230(3):546-53. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24714>.
 47. Singer II, Kawka DW, Kazazis DM, Clark RA. In vivo co-distribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface. *J Cell Biol*. 1984;98(6):2091-106. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.98.6.2091>.
 48. Torr EE, Ngam CR, Bernau K, Tomasini-Johansson B, Acton B, Sandbo N. Myofibroblasts exhibit enhanced fibronectin assembly that is intrinsic to their contractile phenotype. *J Biol Chem*. 2015 Mar 13;290(11):6951-61. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.606186>.
 49. Hernandez-Geo V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:425-56. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246>.
 50. Altrock E, Sers C, Wuerfel C, Vasel M, Kawelke N, Dooley S, et al. Inhibition of fibronectin deposition improves experimental liver fibrosis. *J Hepatol*. 2015;62(3):625-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.06.010>.
 51. Uppal HS, Evans JP, Smith C. Frozen shoulder: A systematic review of therapeutic options. *World J Orthop*. 2015;6(2):263-8. <http://dx.doi.org/10.5312/wjo.v6.i2.263>.
 52. Mullett H, Byrne D, Colville J. Adhesive capsulitis: human fibroblast response to shoulder joint aspirate from patients with stage II disease. *J Shoulder Elbow Surg*. 2007;16(3):290-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jse.2006.08.001>.
 53. Xu Y, Bonar F, Murrell GA. Enhanced expression of neuronal proteins in idiopathic frozen shoulder. *J Shoulder Elbow Surg*. 2012;21(10):1391-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jse.2011.08.046>.
 54. Ryu JD, Kirpalani PA, Kim JM, Nam KH, Han CW, Han SH. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the diabetic frozen shoulder. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons [et al]*. 2006;15(6):679-85.
 55. Kabbabe B, Ramkumar S, Richardson M. Cytogenetic analysis of the pathology of frozen shoulder. *Int J Shoulder Surg*. 2010;4(3):75-8. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-6042.76966>.
 56. Karbe K, Inoue K, Inoue Y, Chen Q. Inducement of mitogen-activated protein kinases in frozen shoulders. *J Orthop Sci*. 2009;14(1):56-61. <http://dx.doi.org/10.1007/s00776-008-1295-6>.
 57. Nago M, Mitsui Y, Gotch M, Nakama K, Shirachi I, Higuchi F, et al. Hyaluronan modulates cell proliferation and mRNA expression of adhesion-related procollagens and cytokines in glenohumeral synovial/capsular fibroblasts in adhesive capsulitis. *J Orthop Res*. 2010;28(6):726-31. <http://dx.doi.org/10.1002/jor.21075>.
 58. Bunker TD, Reilly J, Baird KS, Hamblen DL. Expression of growth factors, cytokines and matrix metalloproteinases in frozen shoulder. *J Bone Joint Surg Br*. 2000;82(5):768-73. <http://dx.doi.org/10.1302/0301-620X.82B5.9888>.
 59. Lho YM, Ha E, Cho CH, Song KS, Min BW, Bae KC, et al. Inflammatory cytokines are overexpressed in the subacromial bursa of frozen shoulder. *J Shoulder Elbow Surg*. 2013;22(5):666-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jse.2012.06.014>.

GLOSSÁRIO

GLOSSÁRIO

Alelos: Genes alelos são segmentos de DNA que se encontram no mesmo *locus* nos cromossomos homólogos. São constituídos de pares adquiridos dos progenitores, mas não são necessariamente idênticos. Assim, podem ser classificados em homozigotos quando são iguais (AA, aa) e heterozigotos (Aa) quando são diferentes.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW): O princípio do EHW estabelece um padrão teórico para o comportamento gênico. Na prática, aponta se uma população se encontra ou não em equilíbrio, chamando a atenção para os possíveis fatores evolutivos que estão atuando. Se nenhum fator evolutivo ocorrer, as frequências dos alelos serão sempre constante durante as gerações. A população idealmente é considerada em equilíbrio quando: o número de indivíduos é infinitamente grande; casamentos são ao acaso; não há seleção natural; nem mutações; nem migração entre populações. É uma importante ferramenta nos estudos de populações naturais. Através dos desvios é possível o estudo das modificações e comportamentos de uma população. Se os pressupostos não forem atendidos por um gene, as frequências alélicas do gene podem mudar, e os resultados devem ser interpretados com cautela.

Genótipo: Refere-se ao conjunto de alelos de um *locus* gênico herdados dos progenitores. Na prática, para estudos genéticos, a expressão é aplicada referindo-se a um genótipo parcial, no qual é especificado um gene ou característica de interesse. Neste sentido, dizemos que indivíduos que possuem o mesmo genótipo determinando uma característica, possuem o mesmo conjunto de genes ou a mesma combinação de alelos.

Haplótipo: É a combinação de um grupo de alelos adjacentes, que fazem parte de um mesmo cromossomo, geralmente herdados como uma unidade (bloco de SNPs) (NUSSBAUM *et al.*, 2008). Fornece informações mais completas e confiáveis da influência dos polimorfismos no genótipo da doença. Por exemplo, quando os genes correspondentes em cromossomos homólogos contêm múltiplas variantes, eles geralmente exibem diferentes padrões de expressão gênica. Isso pode afetar a susceptibilidade de um indivíduo a doenças e resposta a drogas terapêuticas e, portanto, sugere orientações para pesquisa médica e dá subsídio para diagnósticos de padrão molecular (CLARK, 2004).

Locil/ Locus : local fixo no cromossomo onde está determinado gene.

Polimorfismo: Quaisquer dois seres humanos não relacionados compartilham 99,5% de sua sequência de DNA. No restante da sequência, ocorrem variações. Quando a frequência de uma variante alélica atinge mais do que 1% da população, essa variante é chamada polimorfismo. Dessa forma, qualquer sítio que possua alelos múltiplos (duas ou mais variantes de alelos) como componentes estáveis da população é, por definição, polimórfico.

Polimorfismos definem características dos indivíduos e, eventualmente, suscetibilidade à doença, mas não, necessariamente, estão relacionados a consequências patológicas. (FEUK *et al.* 2006)

Polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP): Os polimorfismos de nucleotídeos simples são alterações na sequência de DNA decorrentes da mudança de um único nucleotídeo (ou seja, os alelos correspondentes nos cromossomos homólogos são diferentes e, portanto, o indivíduo é heterozigoto naquele *locus* específico). São o tipo mais comum de variação genética entre as pessoas e ocorrem normalmente ao longo do DNA de uma pessoa, uma vez a cada 300 nucleótidos em média, o que significa que há cerca de 10 milhões de SNPs no genoma humano. Eles podem atuar como marcadores biológicos, ajudando a localizar genes associados à doença. Quando os SNPs ocorrem dentro de um gene, ou em uma região reguladora perto de um gene, eles podem desempenhar um papel mais direto na doença afetando a função do gene (SHAW, 2013). Uma vez que os SNPs são determinados, é possível associar um genótipo ao indivíduo analisado.

STREGA: *STrengthening the REporting of Genetic Association* (STREGA) (LITTLE, HIGGINS, IOANNIDIS *et al.*, 2009). Trata-se de um guia para direcionamento e transparência de estudos de associação genética criado por um grupo interdisciplinar em 2009, baseado no *STrengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* (STROBE) visando melhorar a qualidade das publicações na área de genética. Orienta o uso dos 22 princípios

do STROBE acrescidos de 12 considerações: estratificação populacional, erros de genotipagem, modelo de variação dos haplótipos, equilíbrio de Hardy-Weinberg, replicação, seleção de participantes, justificativa para escolha de genes e variantes, efeitos do tratamento no estudo de características quantitativas, métodos estatísticos, associações estabelecidas, relato descritivo de resultados e o volume de questões de dados que são importantes a considerar em estudos de associação genética.

FONTES CONSULTADAS

Comitê de Ética em Pesquisa [Internet]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Disponível em: www.cep.unifesp.br/cep/