

Leonor Isabel Casilla Loyola

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE GENES DA MATRIZ
EXTRACELULAR EM LESÃO DO LIGAMENTO CRUZADO
ANTERIOR E LESÃO DO MENISCO MEDIAL**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de
Doutor em Ciência

São Paulo
2018

Leonor Isabel Casilla Loyola

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE GENES DA MATRIZ
EXTRACELULAR EM LESÃO DO LIGAMENTO CRUZADO
ANTERIOR E LESÃO DO MENISCO MEDIAL**

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

Orientador:

Prof. Dr. Moisés Cohen

Co-orientadores:

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

Prof. Dr. Benno Ejnisman

São Paulo

2018

Casilla-Loyola, Leonor

Análise de polimorfismos de genes da matriz extracelular em lesão do ligamento cruzado anterior e lesão do menisco medial/ Leonor Isabel Casilla Loyola. -- São Paulo, 2018.

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

Título em inglês: Analysis of polymorphisms of extracellular matrix genes in anterior cruciate ligament tear and medial meniscus tears.

1. Análise de polimorfismos; 2. Lesão de ligamento cruzado anterior; 3. Lesão de menisco medial; 4 Variantes genéticas; 5. Lesões ortopédicas



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL
Departamento de Ortopedia e Traumatologia
Departamento de Morfologia e Genética**

Departamento de Ortopedia e Traumatologia:

Prof. Dr. Moises Cohen

Departamento de Morfologia e Genética:

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

Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional:

Prof.^a Dr.^a Lydia Masako Ferreira

Universidade Federal de São Paulo

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

Vice-Reitor: Prof. Dr. Nelson Sass

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

Este estudo foi desenvolvido nas:

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

e

Disciplina de Genética – Departamento de Morfologia e Genética – Universidade Federal de São Paulo

Auxílios Financeiros:

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

- Auxílio à pesquisa (Temático): número de processo 2012/07721-2
 - Responsável: Moisés Cohen

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

- Bolsa de auxílio à pesquisa (Doutorado Direto): número de processo 2015/02285-8 – Bolsa vinculada ao projeto Temático 2012/07721-2
 - Beneficiária: Leonor Isabel Casilla Loyola

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

- Bolsa Produtividade em Pesquisa nível 2. - Edital MCTI/CNPQ/Universal 14/2012, Faixa A. Processo: n.º 472678/2012-4
 - Beneficiário: Moisés Cohen

ORIENTADOR

Prof. Dr. Moisés Cohen

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

CO-ORIENTADORES

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

Professora Titular do Departamento de Morfologia e Genética
Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

Prof. Dr. Benno Ejnisman

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

EQUIPE DE PESQUISA

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

- Prof. Dr. Moisés Cohen – Professor Titular do Departamento
- Prof.^a Dr.^a Mariana Ferreira Leal – Professora Afiliada do Departamento
- Prof. Dr. Benno Ejnisman – Professor Afiliado do Departamento
- Prof. Dr. Alberto de Castro Pochini - Professor Adjunto do Departamento
- Prof. Dr. Carlos Vicente Andreoli - Professor Adjunto do Departamento
- Dr. Gustavo Gonçalves Arliani - Professor Afiliado do Departamento
- Dr. Diego Costa Astur - Professor Afiliado do Departamento
- Dr. Pedro Debieux - Médico do Grupo de Joelho do Departamento
- Adrielle Martins de Oliveira – Biomédica - Aluna de Iniciação Científica

Disciplina de Genética Departamento de Morfologia e Genética Universidade Federal de São Paulo

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

Leonor Isabel Casilla Loyola

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE GENES DA MATRIZ
EXTRACELULAR EM LESÃO DO LIGAMENTO CRUZADO
ANTERIOR E LESÃO DO MENISCO MEDIAL**

PRESIDENTE DA BANCA: Prof. Dr. Moisés Cohen

BANCA EXAMINADORA

Titulares

Prof.^a Dr.^a Carolina de Oliveira Gigeck

Prof. Dr. Marco Antonio Schueda

Dr. Luis Eduardo Passarelli Tírico

Prof. Dr. Alberto de Castro Pochini

Suplentes:

Prof.^a Dr.^a Fernanda Wisnieski Caires dos Santos

Dr. Leandro Ejnisman

Aprovada em: __/__/____

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Moises Cohen, orientador e responsável pelo grupo de pesquisa diretamente relacionado diretamente com a presente tese. Sempre disposto a ajudar nos momentos mais críticos.

À Prof.^a Dr.^a Mariana Leal, membro essencial para criação e desenvolvimento deste grupo de pesquisa. Sua criatividade para com a ciência foi fundamental para elaboração de vários projetos relacionados direta ou indiretamente com este estudo.

À Prof.^a Dr.^a Marília de Arruda Cardoso Smith, co-orientadora e responsável pela colaboração com a Disciplina de Genética da UNIFESP. Agradeço pela oportunidade, hospitalidade e confiança. A empatia e confiança foi essencial para a elaboração da tese.

À Adrielle Martins de Oliveira, aluna de iniciação científica do grupo de pesquisa. Essencial para a realização de metodologias direta ou indiretamente relacionadas à presente tese. Agradeço pela confiança, companheirismo e principalmente pela amizade.

Aos amigos, colegas, professoras e funcionários da Disciplina de Genética do Departamento de Morfologia e Genética, departamento que possui colaboração com o grupo de pesquisa. Agradeço pela amizade e companheirismo durante todo esse tempo. O conhecimento adquirido em conjunto, seja em reuniões, disciplinas cursadas ou através de participação de comissões do programa de pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional foram fundamentais para minha formação acadêmica e profissional. Obrigada pelo dia-a-dia compartilhado, pela ajuda, pelas risadas e pela amizade estabelecida durante todos esses anos.

Aos médicos membros do grupo de pesquisa, pela colaboração, por realizar a coleta de amostras e dados clínicos dos pacientes inseridos neste estudo, além da colaboração para com o grupo. Uma boa coleta de dados é fundamental para a realização de um bom estudo.

Ao programa de pós-graduação em Cirurgia Translacional e à coordenadora Prof.^a Dr.^a Lydia Masako Ferreira, pela oportunidade de desenvolver este estudo.

Às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento deste estudo.

Por último, mas ainda mais importante. Agradeço aos pacientes que colaboraram para este estudo. A participação de um paciente não deve ser vista somente como amostra e fornecimento de dados. Gostaria de agradecer a todos que voluntariamente concederam sua disponibilidade para participar deste estudo a fim de colaborar com a ciência e futura aplicabilidade clínica.

“A ciência pode lhe dizer o que você consegue fazer, quais as possibilidades disponíveis. Mas não é a ciência que vai lhe dizer, sozinha, que aplicações vamos dar àquela tecnologia que estamos desenvolvendo”

Lygia da Veiga Pereira

Sumário

Agradecimentos	x
Lista de figuras	xv
Lista de abreviaturas e símbolos	xvi
Lista de abreviaturas	xvi
Lista de Símbolos	xvi
Resumo	xvii
Abstract	xix
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo geral	6
2.2. Objetivos específicos	6
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	1
3.1. Joelho.....	1
3.1.1. Ligamento cruzado anterior (LCA)	1
3.1.2. Meniscos.....	2
3.2. Lesão do ligamento cruzado anterior.....	3
3.3. Lesão do menisco medial.....	5
4 MÉTODOS.....	9
4.1. Casuística	9
4.2. Amostras.....	10
4.2.1. Sangue Periférico	10
4.3. Extração e quantificação de DNA	10
4.4. Análise de variantes genéticas	11
4.5. Ancestralidade Molecular	18
4.6. Análise estatística	19
5 RESULTADOS	22
5.1. Análise de polimorfismos em lesão de LCA.....	22
5.2. Análise de polimorfismos em lesão de MM	31
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	41
8 REFERÊNCIAS	43

Anexo 1	48
Anexo 2	50
Apêndice 1	51
Apêndice 2	54

Lista de figuras

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de abreviaturas

Lista de Símbolos

Resumo

Afecções musculoesqueléticas são consideradas a causa mais comum de dor prolongada e de incapacidade física, e afetam todas as faixas etárias e gêneros e em todas as classes sociodemográficas. O ligamento cruzado anterior e o menisco medial estão entre as principais estruturas acometidas durante um processo de lesão não-traumático. A curto prazo essas lesões podem causar instabilidade do joelho e a longo prazo podem ser fator de risco para desenvolver osteoartrose. Sabe-se que as lesões de ligamento cruzado anterior e lesão do menisco medial ocorrem por um conjunto de fatores, intrínsecos e extrínsecos, caracterizando uma doença multifatorial. Fatores genéticos já vem sido associados a essas ou outras afecções musculoesqueléticas, mostrando a importância da investigação de genes envolvidos no processo de degeneração e regeneração da matriz extracelular desses tecidos. O presente estudo buscou identificar 75 variantes genéticas de genes da matriz extracelular associados ao risco de desenvolvimento de lesão do ligamento cruzado anterior e 23 variantes genéticas de genes da matriz extracelular associadas ao risco de desenvolvimento de lesão do menisco medial. Para isso, estudamos 92 indivíduos com lesão de ligamento cruzado anterior confirmado através de diagnóstico por imagem ou durante o momento da artroscopia e 293 indivíduos controles sem lesão de ligamento cruzado anterior. Adicionalmente, também avaliamos 62 indivíduos com lesão do menisco medial e 308 indivíduos controles sem lesão do menisco medial. A análise de polimorfismos foi realizada através da técnica de PCR em tempo real utilizando-se Sondas TaqMan® para discriminação alélica. Foi observada associação de rs2285053 (*MMP2*; $p= 0,024$; OR: 4,67; IC: 1,28-17,05), rs185819 (*TNXB*; $p= 0,01$; OR: 0,58; IC: 0,38-0,89) e rs10434 (*VEGFA*; $p= 0,00091$; OR: 2,36; IC: 1,19-4,66) com o desenvolvimento da lesão de ligamento cruzado anterior. Adicionalmente encontramos associação dos haplotipos C/G/G (rs rs411717/ rs2521206/ rs42524; $p=0,0084$; OR: 2,54; IC: 1,28 – 5,07) em *COL1A2*, C/T (rs2288393/ rs1800449; $p=0,027$; OR: 0,11; IC: 0,01 – 0,77) em *LOX* e A/C/T/T (rs2894232/rs34214527/rs185819/rs1009382; $p=0,0054$; OR: 0,29; IC: 0,13 – 0,69) em *TNXB*. Observamos a associação de rs3106796 (*COL3A1*; $p=0,004$; OR: 5,18; IC: 1,70 – 15,78) e rs17576 (*MMP9*; $p=0,041$; OR: 0,50; IC: 0,26-0,98). Encontramos associação do desenvolvimento da lesão de menisco medial

com os haplótipos G/G (rs1800255/rs3106796; $p=0,02$; OR: 2,04; IC: 1,12 - 3,71) em *COL3A1* e C/T (rs679620/rs522616; $p=0,013$; OR: 2,07; IC: 1,17 – 3,65) em *MMP3*. Portanto, os polimorfismos rs2285053 (*MMP2*) e rs10434 (*VEGFA*) estão associados ao desenvolvimento da lesão de LCA, assim como haplótipos dos genes *COL1A2*, *LOX* e *TNXB*. Enquanto os polimorfismos rs3106796 (*COL3A1*) e rs17576 (*MMP9*) e haplotipos dos genes *COL3A1* e *MMP3* estão associado ao desenvolvimento da lesão de menisco medial.

Abstract

1 INTRODUÇÃO

O tecido musculoesquelético é conhecido por abranger tendões e ligamentos responsáveis principalmente por realizar a comunicação entre musculo-musculo, musculo-esqueleto, ou esqueleto-esqueleto. A ligação entre esses tecidos permite o que organismo possa realizar, principalmente, a movimentação dos membros locomotivos. O tecido musculoesquelético é composto por uma baixa quantidade de células, entretanto, possui uma matriz extracelular rica em fibrilas, fibras colágenas, e outras moléculas.

Lesões do tecido musculoesquelético podem acometer indivíduos de ambos os gêneros, em qualquer idade e independente da classe social. É comum a ocorrência de lesões em ligamentos e tendões que fazem a movimentação ou sustentação do corpo, como por exemplo, lesões abrangendo o tendão de Aquiles, tendão supraespinhal ou ligamento cruzado anterior. Da mesma forma, outros componentes cartilagosos como meniscos interligamentares também podem sofrer lesões por excesso de carga. A lesão pode resultar em dor, incômodo e por vezes, disfunção da região, afetando a movimentação do membro afetado.

Sabe-se que a prática de exercícios é benéfica para a saúde, entretanto, a exposição a esportes de alto impacto pode influenciar no desenvolvimento de lesões não traumáticas em articulações que realizam a movimentação dos membros locomotivos.

Adicionalmente, é conhecido que as afecções musculoesqueléticas apresentam um grande impacto na qualidade de vida dos afetados. Em termos físicos e psicossociais, as afecções musculoesqueléticas influenciam a qualidade de vida dos indivíduos afetados, de seus familiares e em suas carreiras profissionais devido a limitações nas atividades diárias.

De forma geral, mortes por afecções musculoesqueléticas não são relatadas, porém, alguns distúrbios musculoesqueléticos como osteoporose, artrite reumatóide e lesões não traumáticas de articulações dos membros superiores ou inferiores juntamente com o acesso inadequado ao tratamento e situação social carente estão associados à diminuição da expectativa de vida.

Entre as articulações, o joelho é uma das regiões mais afetadas por lesões não traumáticas e é composto por vários ligamentos e outros componentes articulares. O ligamento cruzado anterior (LCA) é uma estrutura da articulação do

joelho que tem como função realizar a estabilidade da articulação permitindo a existência de um limite para o movimento de translação da tíbia em relação ao fêmur, além de ser uma das estruturas responsáveis por prevenir a hiperextensão do joelho.

Adicionalmente, um exemplo de outro componente articular importante do joelho é a presença de estruturas chamadas meniscos que possuem como função constituir uma área de contato entre a tíbia e o fêmur, auxiliar na absorção de choque, influenciar na melhor distribuição de carga, além de auxiliar na estabilidade da articulação. Apesar de serem estruturas de composição igual, possuem formas diferentes e são conhecidos como menisco lateral e menisco medial (MM).

As duas estruturas citadas, LCA e MM são componentes articulares que possuem alta incidência a desenvolver lesão não traumática. As lesões que acometem estruturas como o LCA ou o MM podem ser ocasionadas durante um movimento brusco no qual a rotação do joelho é realizada de forma desequilibrada, podendo romper parcial ou totalmente essas estruturas. Essas lesões podem também estar associadas a outras lesões prévias.

As lesões não traumáticas de tecido musculoesquelético são conhecidas por envolver determinados fatores extrínsecos (ambientais), como por exemplo a prática de atividade física e a presença de comorbidades associadas. Entretanto, fatores intrínsecos possivelmente atrelados ao desenvolvimento das lesões foi pouco estudado até o momento. A predisposição genética ao desenvolvimento de afecções ortopédicas vem sendo estudadas nos últimos anos por alguns grupos multidisciplinares com o intuito de identificar possíveis polimorfismos (variantes genéticas) de genes possivelmente envolvidos no processo de desenvolvimento de lesões de tendões e ligamentos.

Genes que atuam na matriz extracelular (MEC) do tecido musculoesquelético tem como função realizar a manutenção do tecido através do equilíbrio do processo de degeneração e regeneração. A homeostase da MEC permite a capacidade de resistir à força mecânica externa e auxilia no reparo de pequenas lesões.

A expressão dos genes presentes na MEC do tecido estudado pode ser alterada por variantes genéticas chamadas de polimorfismos. Um dos tipos de

polimorfismos mais bem estudados são os *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) que consistem na troca de um nucleotídeo em determinado *loci*.

Alguns estudos demonstraram a relação entre SNPs de genes da MEC e desenvolvimento de lesão do tecido musculo esquelético. A lesão no tendão de Aquiles, lesão do manguito rotador e desenvolvimento de capsulite adesiva mostram que alterações no DNA podem influenciar a susceptibilidade de um indivíduo desenvolver lesões ortopédicas, caracterizando essas afecções como de origem multifatorial.

A investigação de fatores intrínsecos como a identificação de polimorfismos de genes da MEC associados à susceptibilidade de desenvolver lesão de LCA ou MM, a longo prazo, poderá auxiliar na determinação mais precisa do prognóstico e no estabelecimento de uma conduta terapêutica mais precisa e individualizada.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar o papel de polimorfismos de genes da matriz extracelular em amostras de pacientes com e sem lesão do ligamento cruzado anterior e pacientes com e sem lesão do menisco medial

2.2. Objetivos específicos

- Comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos dos genes *COL1A1* (rs1800012), *COL1A2* (rs42524), *COL2A1* (rs3737548 e rs2276455), *COL3A1* (rs1800255 e rs3106796), *COL5A1* (rs3196378 e rs12722), *COL12A1* (rs240736 e rs970547), *FN1* (rs6728999), *TNC* (rs2104772), *TNXB* (rs185819 e rs1009382), *COMP* (rs12327738 e rs28494505), *PLOD1* (rs2273285), *PLOD2* (rs6710) e *LOX* (rs1800449), *FGF2* (rs1476217 e rs3747676), *FGF3* (rs308395), *FGF5* (rs6838203 e rs3733336), *FGFR1* (rs13317 e rs2467531), *GHR* (rs4590183 e rs6180), *IGF1* (rs35767, rs6220 e rs6214), *LUM* (rs2268578), *PDGFB* (rs5757577), *PDGFC* (rs1425486), *PDGFRB* (rs2229562), *THBS4* (rs404375 e rs438042), *VEGFA* (rs2010963, rs10434 e rs699947), *VEGFC* (rs3775203), *VEGFD* (rs6632528), *ACAN* (rs2351491), *BGN* (rs1042103), *DCN* (rs516115 e rs3138167), *FMOD* (rs7543148), *COL1A1* (rs2075559 e rs2696247), *COL1A2* (rs411717 e rs2521206), *COL2A1* (rs954326 e rs1635529), *COL3A1* (rs1800255), *COL5A1* (rs13946, rs1134170 e rs4504708), *COMP* (rs35359254), *FN1* (rs11651 e rs1263), *LOX* (rs2288393), *TNC* (rs7035322, rs13321 e rs1330363) e *TNXB* (rs2894232 e rs34214527) entre pacientes com lesão do LCA e indivíduos controles, além de verificar se a população estudada encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg
- Comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos de *COL1A1* (rs1800012), *COL1A2* (rs42524), *COL2A1* (rs3737548 e rs2276455), *COL3A1* (rs1800255 e rs3106796), *FN1* (rs6728999), *TNC* (rs2104772), *TNXB* (rs185819 e rs1009382), *COMP* (rs12327738 e rs28494505), *PLOD1* (rs2273285), *PLOD2* (rs6710) e *LOX* (rs1800449), entre pacientes com lesão do menisco e indivíduos controles, além de verificar se a população estudada encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Joelho

O joelho é composto por duas articulações principais chamadas de tibiofemorais e patelofemoral. A primeira articulação citada permite a distribuição do peso do corpo de forma equilibrada. Já a articulação patelofemoral juntamente com o musculo quadríceps atuam para dissipar o impulso para frente durante o início do processo de marcha(1)

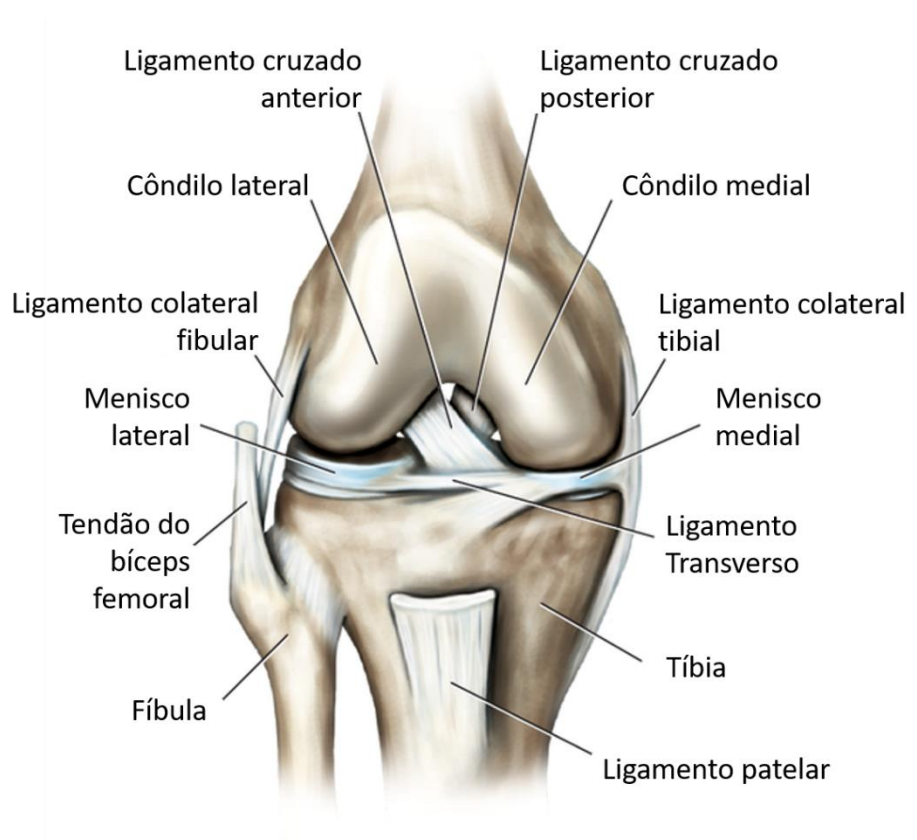


Figura 1 - Anatomia do joelho.

Estruturas do joelho (Imagem modificada de: <https://www.physio-pedia.com/images/7/7b/Structures_of_the_knee.png>).

3.1.1. Ligamento cruzado anterior (LCA)

O ligamento cruzado anterior possui sua origem na superfície póstero-lateral do intercondilo e se estende distalmente e anteriormente até inserir-se na eminencia intercondilar (1). A estrutura do LCA varia de 25 a 35 mm de comprimento, aproximadamente 10 mm de largura. São compostos por tecido conjuntivo denso de

cor branca-prateada, esse tipo de tecido são de consistência dura e pouco maleável. Os ligamentos de forma geral, contém fibroblastos que são responsáveis pela formação de fibras de colágenos, principal componente da matriz extracelular desse tecido. As fibras de colágenos estão agrupadas de forma regular e de forma paralela entre si, formando um arranjo que oferece resistência mecânica para movimentos de extensão do joelho. Entre os 28 tipos de fibras de colágeno, os tipos I e III são os mais presentes no LCA, além de outros componentes da MEC principalmente proteoglicanos e outros compostos (1, 2).

O LCA permite uma prevenção a hiperextensão do joelho, uma vez que durante uma extensão completa se aproxima da superfície intercondilar e impedindo a extensão exacerbada(1). O LCA é também uma das estruturas responsáveis pela resistência a translação anterior do joelho, assim como orienta a rotação da tíbia durante o mecanismo “screw-home” quando o joelho é estendido, e também atua na translação durante a rotação axial da tíbia (1).

3.1.2. Meniscos

Os meniscos localizam-se entre os côndilos do fêmur e a superfície da tíbia, são estruturas macias de cor esbranquiçada, possuem formato semicircular transversalmente, superfície superior ligeiramente convexa e superfície lateral fina (1, 3, 4).

As células que compõem a estrutura dos meniscos são os fibrocondrócitos, que possuem uma mistura morfológica de fibroblastos e condrócitos. Estruturalmente, as células que compõem a superfície dos meniscos tendem a ter aparência mais próxima dos fibroblastos, enquanto as células mais internas do menisco possuem mais características de condrócitos(1, 3, 5).

A MEC dos meniscos é constituída principalmente de água e colágeno, sendo uma pequena porcentagem composta de proteoglicanos, proteínas não-colagenosas e glicoproteínas (5). O colágeno do tipo I é predominante na MEC dos meniscos, seguida dos tipos II, III, V e VI. As fibras de colágeno se compõem a fim de prover a integridade estrutural dos meniscos. Os proteoglicanos presentes na MEC atuam provendo hidratação do tecido permitindo, dessa forma, a alta resistência a peso que a estrutura compõe (3, 5).

A estrutura dos meniscos garante um importante papel durante o choque de absorção, auxilia na nutrição e lubrificação do joelho, além de auxiliar no transporte de fluidos a estruturas avasculares através da comunicação via microcanais.(5)

3.2.Lesão do ligamento cruzado anterior

O LCA está entre as principais estruturas lesionadas no joelho e ocorre em aproximadamente 70% da população que pratica alguma atividade física (6). Nos Estados Unidos, estima-se que mais de 200 000 casos de lesão do LCA, sendo que metade desses casos requerem a realização de artroscopia, cirurgia para reconstrução do LCA (7, 8). A reconstrução desse ligamento é realizada através da artroscopia como tratamento (9). Sabe-se que a reconstrução do LCA foi um dos procedimentos ortopédicos mais comuns (6, 10).

Sabe-se que a lesão do LCA possui alta incidência em jovens ativos, principalmente entre mulheres (11). A curto prazo a ruptura do LCA pode ocasionar instabilidade e a longo prazo pode influenciar no desenvolvimento de doenças degenerativas do joelho, como por exemplo, a osteoartrose (12). Apesar da reconstrução do LCA ou de tratamento conservador (reabilitação e modificação de atividades físicas), estudos mostram que os indivíduos afetados por essa afecção são mais frequentemente acometidos pelo desenvolvimento de osteoartrose no futuro (11). Atualmente, a osteoartrose é considerada um problema de saúde pública por se tratar da doença mais prevalente e a causa isolada mais comum de incapacidade em indivíduos acima dos 18 anos (13, 14). Observou-se um aumento da incidência e prevalência da osteoartrite de acordo com o aumento da idade, acometendo mais que o dobro de indivíduos quando comparado a doenças cardíacas (13, 14) e sendo um dos principais gastos com saúde nos Estados Unidos, gerando 65 bilhões de gastos no ano de 2000 (15).

A lesão do LCA ocorre por um mecanismo não traumático, geralmente torcional e durante a prática esportiva(16, 17). Um dos esportes que mais apresenta risco de limitação profissional e lesões de LCA é o futebol, esporte comumente praticado no Brasil (16-18)

Diversos estudos foram realizados para determinar possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de lesão de LCA e assim auxiliar a desenvolver estratégias

de prevenção(16, 19). Com isso, é consenso que a lesão do LCA é considerada uma doença multifatorial, com uma inter-relação complexa entre os principais fatores de risco (20).

Mulheres possuem maior incidência a lesões do LCA (20), já que apresentam menor LCA, resultando em menor rigidez linear, menor capacidade de alongamento antes de romper e menor energia de absorção, além de possui mais chances de romper quando submetido a cargas menores. Além disso, mulheres também apresentam maior frouxidão ligamentar e rigidez muscular reduzida e as diferenças hormonais também influenciam na fisiologia do tecido ligamentar (20). A etnia dos indivíduos também deve ser considerada como fator de risco para o desenvolvimento de lesão do LCA. Trojian e Collins (21) reportaram que atletas de origem caucasiana apresentam 6.6 vezes mais frequentemente lesões do LCA em comparação com outros grupos étnicos. No entanto, o número de pacientes diagnosticados com lesão desse ligamento era pequeno (N=9), e a classificação de etnia foi dada de acordo com a origem ancestral, e não com base em marcadores moleculares. Esses resultados sugerem que análises multivariadas com o intuito de identificar fatores de risco para lesões do LCA devem ser ajustadas não somente por sexo e faixa etária (ou mesmo desenvolver modelos separado para tais elementos), mas também por etnia. Cabe ressaltar que a Hiper mobilidade Generalizada Articular (HGA), um dos possíveis fatores de risco para lesão do LCA, varia de acordo com a etnia (22-24).

Alguns estudos da literatura sugerem que a HGA é um fator de risco para lesão do LCA. Kramer e colaboradores (25) observaram que pacientes com histórico de lesões desse ligamento apresentavam maior frouxidão generalizada, além de maior geno recurvato e menor flexibilidade da banda iliotibial. No entanto, somente 33 casos e 33 controles foram analisados nesse estudo. Uhorchak e colaboradores (26) descreveram que mulheres atletas com menor restrição passiva do movimento articular, indicado pela HGA maior que um desvio padrão da média, tinham risco aumentado de lesão do LCA. Porém, somente 24 de 895 indivíduos avaliados possuíam esse tipo de lesão. Ramesh e colaboradores (27), em um estudo maior com 169 pacientes com lesão do LCA e 169 controles pareados por gênero e idade, observaram que lesões do LCA eram mais frequentes em pacientes com HGA, especificamente do que naqueles com maior frouxidão da articulação do joelho.

Embora alguns autores reportem que há evidências suficientes na literatura que sugerem que a via final de uma lesão do LCA sem contato é a hiperextensão de joelho (28, 29), poucos casos de lesões do LCA, com exceção do estudo de Ramesh e colaboradores (27), foram avaliados em estudos anteriores. Dessa forma, ainda é necessário validar os resultados de Ramesh e, principalmente, realizar análises ajustando os resultados não somente por sexo e idade, mas também por etnia, uma co-variável bem descrita para HGA.

Algumas décadas atrás estudos demonstraram que existe predisposição familiar para a ruptura do LCA (12, 30-32). Harner e colaboradores observaram que 35% dos pacientes com lesão de LCA possuíam histórico familiar de ruptura do ligamento, enquanto somente 4% do grupo controle (sem lesão) possuía um membro da família afetado (31). Flynn e colaboradores observaram que sujeitos com histórico de lesão do LCA possuem duas vezes mais chances de ter um parente de primeiro grau afetado do que os do grupo controle sem histórico dessa lesão (32). Sugerindo que fatores genéticos estão envolvidos no risco de desenvolver a lesão de LCA. Adicionalmente, estudos associaram polimorfismos ao risco de desenvolver a doença (33-42).

Young e colaboradores demonstraram que os níveis de proteínas do tipo proteoglicanos eram mais baixas na MEC de amostras com lesão de LCA. Os baixos níveis de proteoglicanos podem influenciar na regeneração e homeostasia do tecido, dificultando a função da estrutura, principalmente para sustentar altas cargas (43).

3.3.Lesão do menisco medial

Lesão dos meniscos estão entre as lesões mais comuns de joelho e podem acometer indivíduos de idade (44). No entanto, lesões meniscais são comuns em pacientes jovens e atleticamente ativos, sendo responsáveis por aproximadamente 15% do total das lesões no joelho nesse grupo populacional (45). A incidência de lesões meniscais é de 60 a 70:100.000 indivíduos por ano, com os indivíduos do gênero masculino apresentando esse tipo de lesão mais frequentemente do que os do gênero feminino (2,5 a 4:1) (45). Devido à alta incidência, as cirurgias de menisco estão entre as cirurgias mais comuns realizadas na ortopedia (46, 47). A perda da integridade dos meniscos está associada à instabilidade e a rápida e severa

degeneração articular(48-50). Embora o mecanismo não seja compreendido, existe uma relação entre lesão meniscal e o acometimento inevitável de osteoartrose degenerativa (51). Esses dados evidenciam que as lesões meniscais têm um forte impacto na saúde de jovens e de idosos.

Normalmente essas lesões são causadas por eventos traumáticos. Os esportes de contato são as principais causa de lesões meniscais, que geralmente são observadas em combinação com lesões de ligamentos, especialmente quando o menisco medial é envolvido (52). As lesões no menisco medial ocorrem mais frequentemente do que as lesões no menisco lateral, e cerca de um terço dessas lesões ocorre concomitantemente com lesões do LCA (53). É importante informar que pacientes com lesões de menisco e LCA possuem maior risco de desenvolver osteoartrose quando comparados a pacientes com ruptura de LCA isolada (59% versus 31%) (23).

As lesões meniscais são frequentemente causadas pelo impacto da torção do joelho (52) e são geralmente observadas em jogadores de futebol (53). As lesões de menisco também podem ser causadas pela hiperextensão ou hiperflexão do joelho, mecanismos que também podem ocorrer durante atividades esportivas.

A etiologia de lesões de menisco ainda não está totalmente entendida. Uma vez que somente os fatores extrínsecos não explicam a ocorrência ou não da lesão meniscal, fatores intrínsecos predisponentes podem influenciar o risco para ocorrência dessas lesões. Grupos com maior idade, com obesidade e com músculo quadríceps fraco apresentam maior risco para lesões do menisco (54-57). Englund e colaboradores (55) reportaram que o alargamento de 5 ou mais articulações interfalangeanas e o mal alinhamento em varo do joelho também são possíveis fatores de risco para lesão meniscal, porém esses achados ainda não foram confirmados em outras populações.

Adicionalmente, Sturup e colaboradores (58) reportaram uma associação entre hiper mobilidade anteroposterior do joelho e lesão do menisco medial (N=17), sugerindo que a frouxidão ligamentar pode ser um fator de risco para lesão meniscal. Baker e colaboradores (54) descreveram uma associação entre a HGA e lesões degenerativas do menisco independentemente da atividade ocupacional, prática esportiva e obesidade. Porém, esse estudo ainda precisa ser reproduzido em

outras populações para confirmar se a HGA, assim como a frouxidão ligamentar, são fatores de risco para lesão do menisco em modelos de análise multivariada.

Mais estudos são necessários para identificar fatores intrínsecos relacionados à etiopatologia de lesões meniscais. Fatores genéticos também podem estar associados ao risco dessas lesões, como já reportado para HGA e para outras lesões ortopédicas, incluindo osteoartrose e lesão da LCA.

4 MÉTODOS

4.1. Casuística

Foram incluídos no grupo caso indivíduos: de ambos os gêneros; acima de 18 anos; com diagnóstico de lesão das articulações LCA ou MM por meio de avaliação clínica ou de imagem; com lesão total confirmada no momento da cirurgia (59).

Os pacientes foram recrutados no serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital São Paulo (HSP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) entre 2013 e 2016. Os pacientes obtiveram diagnóstico por médicos do nosso grupo de pesquisa através de exame clínico ou no momento da realização da artroscopia. Dessa forma, foram obtidas amostras de sangue de 238 pacientes com lesão do ligamento cruzado anterior e de 171 pacientes com lesão do menisco medial.

Para constituir o grupo controle entrevistamos pacientes também provenientes do HSP, entretanto, atendendo aos seguintes critérios de inclusão: ser fisicamente ativo; ter capacidade funcional do joelho e das demais articulações; não possuir histórico de diagnóstico clínico de lesão de articulações e não possuir histórico familiar de lesão de LCA ou MM; assim como não ter histórico de tratamento cirúrgico para lesão de articulações. Dessa forma, foram obtidas amostras de sangue de 1042 indivíduos saudáveis (voluntários).

Todos os indivíduos que participaram deste estudo responderam a um questionário geral autoaplicável abordando, dados como peso, altura, presença de comorbidades clínicas, histórico individual e familiar de lesões do sistema musculoesquelético, uso de medicamentos contínuos, etc. (Anexo 1) com a supervisão de um dos participantes do grupo de pesquisa. Além disso, todos os participantes responderam ao questionário de Avaliação de Hiperfrouxidão ligamentar Generalizada (Anexo 2)

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da UNIFESP (CEP nº 965.530, Apêndice 1). O termo de consentimento livre e esclarecido assinado foi obtido de todos os pacientes antes da coleta das amostras de sangue (Apêndice 2).

4.2. Amostras

4.2.1. Sangue Periférico

Amostras de sangue periférico foram obtidas de todos os indivíduos avaliados. As amostras de sangue foram coletadas em tubos à vácuo contendo o anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras foram coletadas em duplicidade para todos os indivíduos avaliados, resultando em aproximadamente 7 mililitros (mL) de sangue por paciente ou controle do presente estudo. As amostras foram armazenadas em temperatura de 4 °C até o momento de extração do DNA.

4.3. Extração e quantificação de DNA

O processo de extração consiste em diferentes etapas de purificação de componentes do sangue a fim de obter a precipitação do DNA presente nos leucócitos. A extração de DNA foi realizada por meio da utilização do *Gentra Puregene Kit*[®] (Qiagen, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante.

Dessa forma, para realizar a etapa de lise de hemácias, homogeneizamos 3 mL de amostra de sangue periférico com 9 mL de *Red Blood Cell Lysis Solution*. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos (min). Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 min a 2.000 gravidades (g). Após o processo, o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado, restando apenas o pellet de leucócitos. Para realizar o processo de lise de leucócitos do *pellet* foram adicionados 3 mL de *Cell Lysis Solution*. As amostras foram homogeneizadas vigorosamente e incubadas à 37 °C em banho-maria por 30 min. Em seguida, para o processo de precipitação de proteínas, foi adicionado 1 mL de *Protein Precipitation Solution* em cada amostra, seguido de homogeneização por agitador do tipo vortex e centrifugação a 2.000 g por 10 min.

Após todo o processo de purificação, o sobrenadante que contém o DNA foi transferido para outro tubo contendo 3 mL de isopropanol. Dessa forma, com a homogeneização do sobrenadante com o isopropanol obteve-se a precipitação do DNA. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 2.000 g por 4 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 3 mL de etanol 70% em cada amostra para realizar a lavagem do pellet de DNA seguido de centrifugação a 2.000 g por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o tubo contendo somente o *pellet* de DNA foi

deixado em repouso à temperatura ambiente por 15 min. Por último, para solubilizar o *pellet* de DNA, foi adicionado 250 µL de *DNA Hydration Solution* seguido de incubação à 37 °C *overnight* em banho-maria.

A qualidade e quantificação do DNA de cada amostra foi determinada a partir da utilização de espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000* (*Thermo Scientific*, Wilmington, EUA). Sendo incluídas no presente estudo somente as amostras com relação de absorvância (A)₂₆₀/A₂₈₀ nm maior que 1,80.

4.4. Análise de variantes genéticas

As amostras de DNA foram genotipadas para os polimorfismos mencionados na Tabela 1. utilizando-se o método de PCR em tempo real no termociclador *Applied Biosystems 7500 fast real-time PCR system*[®] (*Thermo Scientific*, Wilmington, EUA). Sondas *TaqMan*[®] e *primers* comercialmente disponíveis (*Thermo Scientific*, Wilmington, EUA) foram utilizados para a metodologia mencionada. Informações referente aos ensaios utilizados encontram-se na Tabela 1.

A metodologia de PCR em tempo real consiste na utilização de duas sondas alelo-específicas marcadas com duas fluorescências distintas (VIC e FAM). Cada fluorescência é específica para um alelo, permitindo a discriminação das duas variantes para os SNPs estudados, uma vez que os alelos são discriminados obtém-se o genótipo do indivíduo avaliado.

Por tratar-se de investigação de polimorfismos em células de organismos diploides, existem 2 alelos possíveis para cada SNP avaliado. Dessa forma, o genótipo dos indivíduos estudados pode ser 1) heterozigoto quando houver uma cópia de cada alelo possível para aquele determinado SNP ou 2) homozigoto quando houver duas cópias de um mesmo alelo, podendo ser homozigoto para alelo 1 ou homozigoto para o alelo 2

Tabela 1. Relação de informações dos polimorfismos utilizados no estudo

Gene	Identificação do SNP	Grupo	MAF	Localização do polimorfismo	Informações do ensaio utilizado			Sequência VIC/FAM do ensaio
					Identificação do ensaio	Tipo de ensaio	Tipo de SNP	
<i>ACAN</i>	rs2351491	LCA	T=0.3500/1753	Chr.15: 88854874 on GRCh38	C__25474736_10	Funcionalmente testado	Silent Mutation, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>BGN</i>	rs1126499	LCA	T=0.3354/1266	Chr.8: 38468277 on GRCh38	C__2617574_1_	Ensaio validado	Transition Substitution, Silent Mutation, Intragenic	C/T
<i>BGN</i>	rs1042103	LCA	A=0.1727/652	Chr.X: 153508573 on GRCh38	C__8898142_10	Funcionalmente testado	Transition Substitution, UTR 3, Intragenic	A/G
<i>COL12A1</i>	rs240736	LCA	G=0.2650/1327	Chr.6: 75138465 - 75138465 on Build GRCh38	C__3278190_10	Validado	Transition Substitution, Mis-sense Mutation, Intragenic	A/G
<i>COL12A1</i>	rs970547	LCA	C=0.2881/1443	Chr.6:75087586 on Build GRCh38	C__7580617_10	Validado	Mis-sense Mutation, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>COL1A1</i>	rs1800012	LCA e MM	A=0.0911/456	Chr.17:50200388 on Build GRCh38	C__7477170_30	Funcionalmente testado	Intron, Transversion Substitution, Intragenic	A/C
<i>COL1A1</i>	rs2075559	LCA	G=0.4587/2297	Chr.17: 50189930 on GRCh38	C__1840245_1_	Validado	Transversion Substitution, Intergenic / Unknown, Intragenic	C/G
<i>COL1A1</i>	rs2696247	LCA	G=0.1989/996	Chr.17: 50192542 on GRCh38	C__16061186_10	Funcionalmente testado	Intron, Transition Substitution, Intragenic	A/G
<i>COL1A2</i>	rs42524	LCA e MM	C=0.1783/893	Chr.7:94413927 on Build GRCh38	C__2258177_20	Funcionalmente testado	Intergenic / Unknown, Transversion Substitution	C/G
<i>COL1A2</i>	rs411717	LCA	C=0.4822/2415	Chr.7: 94403719 on GRCh38	C__2601126_1_	Validado	Intron, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>COL1A2</i>	rs2521206	LCA	G=0.3095/1550	Chr.7: 94409875 on GRCh38	C__22273909_10	Funcionalmente testado	Transition Substitution, Intron, Intragenic	A/G
<i>COL2A1</i>	rs3737548	LCA e MM	T=0.2192/1098	Chr.12: 47997633 - 47997633 on Build GRCh38	C__25606536_10	Funcionalmente testado	Intergenic / Unknown, Transversion Substitution	G/T
<i>COL2A1</i>	rs2276455	LCA e MM	A=0.4279/2143	Chr.12: 47982354 - 47982354 on Build GRCh38	C__15881616_10	Validado	Transition Substitution, Intron, Intragenic	G/A

<i>COL2A1</i>	rs954326	LCA	T=0.2784/1394	Chr.12: 48001040 on GRCh38	C___8725121_10	Funcionalmente testado	Transversion Substitution, Intron, UTR 5, Intragenic	G/T
<i>COL2A1</i>	rs1635529	LCA	T=0.2953/1479	Chr.12: 48001319 on GRCh38	C___8725130_10	Validado	Transversion Substitution, Intron, UTR 5, Intragenic	G/T
<i>COL3A1</i>	rs3106796	LCA e MM	G=0.3708/1857	Chr.2: 188985047 - 188985047 on Build GRCh38	C___1729164_10	Validado	Intron, Transition Substitution, Intragenic	A/G
<i>COL3A1</i>	rs1800255	LCA e MM	A=0.2185/1094	Chr.2: 188999354 on GRCh38	C___7477926_10	Funcionalmente testado	Transition Substitution, Mis-sense Mutation, Intragenic	A/G
<i>COL5A1</i>	rs3196378	LCA	A=0.3253/1629	Chr.9:134843036 on Build GRCh38	C___370253_10	Funcionalmente testado	Transversion Substitution, UTR 3, Intron, Intragenic	A/C
<i>COL5A1</i>	rs12722	LCA	T=0.3494/1750	Chr.9:134842570 on Build GRCh38	C___370252_20	Funcionalmente testado	UTR 3, Transition Substitution, Intron, Intragenic	C/T
<i>COL5A1</i>	rs4504708	LCA	G=0.2426/1215	Chr.9: 134844698 on GRCh38	C__25973701_10	Funcionalmente testado	Intron, UTR 3, Transversion Substitution, Intragenic	G/T
<i>COL5A1</i>	rs13946	LCA	C=0.2486/1245	Chr.9: 134842386 on GRCh38	C___8721600_10	Validado	UTR 3, Intron, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>COL5A1</i>	rs1134170	LCA	A=0.3936/1971	Chr.9: 134843428 on GRCh38	C___8721606_20	Funcionalmente testado	Transversion Substitution, Intron, UTR 3, Intragenic	A/T
<i>COMP</i>	rs12327738	LCA e MM	A=0.1987/995	Chr.19: 18784408 on GRCh38	C__11706140_10	Funcionalmente testado	Transition Substitution, Intron, Intragenic	A/G
<i>COMP</i>	rs35359254	LCA	G=0.1144/573	Chr.19: 18790809 on GRCh38	C___2544444_10	Funcionalmente testado	Transversion Substitution, Intron, Intragenic	C/G
<i>COMP</i>	rs28494505	LCA e MM	G=0.2222/1113	Chr.19: 18783001 on GRCh38	C__60841844_10	Funcionalmente testado	Intron, Transition Substitution, Intragenic	A/G
<i>DCN</i>	rs516115	LCA	C=0.4105/2056	Chr.12: 91163515 on GRCh38	C___2309580_10	Funcionalmente testado	Intron, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>DCN</i>	rs3138167	LCA	T=0.1548/775	Chr.12: 91178638 on GRCh38	C___2675820_10	Validado	Intron, UTR 5, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>FGF2</i>	rs1476217	LCA	C=0.4824/2416	Chr.4: 122897356 on GRCh38	C___8837787_10	Funcionalmente testado	Transversion Substitution, UTR 3, Intron, Intragenic	A/C

<i>FGF2</i>	rs3747676	LCA	C=0.3484/1745	Chr.4: 122896919 on GRCh38	C__27476294_10	Funcionalmente testado	UTR 3, Intron, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>FGF3</i>	rs308395	LCA	G=0.3590/1798	Chr.4: 122825787 on GRCh38	C___802990_10	Validado	Transversion Substitution, Intron, Intragenic	C/G
<i>FGF5</i>	rs3733336	LCA	G=0.2905/1455	Chr.4: 80286809 on GRCh38	C__25803638_10	Validado	UTR 3, Transition Substitution, Intragenic	A/G
<i>FGF5</i>	rs6838203	LCA	A=0.2929/1467	Chr.4: 80287838 on GRCh38	C___1678562_10	Funcionalmente testado	Transversion Substitution, UTR 3, Intragenic	A/T
<i>FGFR1</i>	rs13317	LCA	C=0.2250/1127	Chr.8: 38411996 on GRCh38	C___1358324_10	Validado	Transition Substitution, UTR 3, Intron, Intragenic	C/T
<i>FMOD</i>	rs7543148	LCA	T=0.3500/1753	Chr.1: 203348034 on GRCh38	C___9702305_10	Funcionalmente testado	Transition Substitution, Silent Mutation, Intragenic	C/T
<i>FN1</i>	rs6728999	LCA e MM	T=0.0351/176	Chr.2: 215370323 on GRCh38	C__25592960_30	Funcionalmente testado	Intergenic / Unknown, Transition Substituo	C/T
<i>FN1</i>	rs11651	LCA	G=0.2827/1416	Chr.2: 215364969 on GRCh38	C___71462_10	Validado	Transition Substitution, Intron, Silent Mutation, Intragenic	A/G
<i>FN1</i>	rs1263	LCA	G=0.4734/2371	Chr.2: 215360620 on GRCh38	C___477058_10	Funcionalmente testado	Intron, UTR 3, Transition Substitution, Intragenic	A/G
<i>FN1</i>	rs940739	LCA	A=0.2913/1459	Chr.2: 215391428 on GRCh38	C___2110678_10	Functionally Tested	Transversion Substitution, Intron, Intragenic	A/T
<i>GHR</i>	rs4590183	LCA	C=0.3301/1653	Chr.5: 42626104 on GRCh38	C___423240_10	Funcionalmente testado	Transition Substitution, Intron, Intragenic	C/T
<i>GHR</i>	rs6180	LCA	C=0.3301/1653	Chr.5: 42719137 on GRCh38	C___2841422_10	Validado	Transversion Substitution, UTR 3, Mis-sense Mutation, Intragenic	A/C
<i>IGF1</i>	rs35767	LCA	A=0.3037/1521	Chr.12: 102481791 on GRCh38	C___799146_10	Validado	Transition Substitution, Intron, Mis-sense Mutation, Intragenic	A/G
<i>IGF1</i>	rs6214	LCA	T=0.4269/2138	Chr.12: 102399791 on GRCh38	C__11495137_10	Funcionalmente testado	Transition Substitution, UTR 3, Intron, Intragenic	C/T
<i>IGF1</i>	rs6220	LCA	G=0.3614/1810	Chr.12: 102400737 on GRCh38	C___2801119_10	Funcionalmente testado	UTR 3, Intron, Transition Substitution, Intragenic	A/G
<i>LOX</i>	rs1800449	LCA e MM	T=0.1567/785	Chr.5: 122077513 on Build GRCh38	C___7574719_10	Funcionalmente testado	Mis-sense Mutation, Intron, Transition Substitution, Intragenic	C/T

<i>LOX</i>	rs2288393	LCA	G=0.1300/651	Chr.5: 122077195 on GRCh38	C__16184410_10	Funcionalmente testado	Transversion Substitution, UTR 5, Intron, Intragenic	C/G
<i>LUM</i>	rs2268578	LCA	A=0.3395/1700	Chr.12: 91107421 on GRCh38	C__15874884_10	Funcionalmente testado	Intron, Transition Substitution, Intragenic	A/G
<i>MMP13</i>	rs2252070	LCA e MM	C=0.3640/1823	Chr.11:102955810 on Build GRCh38	C__25474083_10	Validated	Intron, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>MMP2</i>	rs243865	LCA e MM	T=0.1366/684	Chr.16:55477894 on Build GRCh38	C__3225943_10	Functionally Tested	Intron, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>MMP2</i>	rs2285053	LCA e MM	T=0.1512/757	Chr.16:55478465 on Build GRCh38	C__26734093_20	Functionally Tested	Intron, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>MMP2</i>	rs243866	LCA e MM	A=0.1344/673	Chr.16:55477625 on Build GRCh38	C__3225942_10	Functionally Tested	Intergenic / Unknown, Transition Substitution	A/G
<i>MMP3</i>	rs679620	LCA e MM	T=0.3478/1742	Chr.11:102842889 on Build GRCh38	C__3047717_1_	Validated	Mis-sense Mutation, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>MMP3</i>	rs522616	LCA e MM	C=0.3153/1579	Chr.11:102844317 on Build GRCh38	C__3047714_10	Validated	Transition Substitution, Intron, Intragenic	C/T
<i>MMP9</i>	rs17576	LCA e MM	G=0.4555/2281	Chr.20:46011586 on Build GRCh38	C__11655953_10	Validated	Mis-sense Mutation, Transition Substitution, Intrageni	A/G
<i>MMP9</i>	rs17577	LCA e MM	A=0.1909/956	Chr.20:46014472 on Build GRCh38	C__11655948_1_	Validated	Intergenic / Unknown, Transition Substitution	A/G
<i>PDGFB</i>	rs5757577	LCA	A=0.4920/2464	Chr.22: 39246689 on GRCh38	C__2486095_10	Funcionalmente testado	Intergenic / Unknown, Transition Substitution	A/G
<i>PDGFC</i>	rs1425486	LCA	C=0.4665/2336	Chr.4: 156762533 on GRCh38	C__1397673_10	Validado	UTR 3, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>PDGFRB</i>	rs2229562	LCA	C=0.3189/1597	Chr.5: 150115690 on GRCh38	C__3220594_10	Funcionalmente testado	UTR 3, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>PLOD1</i>	rs2273285	LCA e MM	T=0.1448/725	Chr.1: 11950412 on GRCh38	C__16178436_10	Funcionalmente testado	Transversion Substitution, Mis-sense Mutation, Intragenic	G/T
<i>PLOD2</i>	rs6710	LCA e MM	T=0.4888/2448	Chr.3:146070680 on Build GRCh38	C__7554622_10	Funcionalmente testado	UTR 3, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>THBS4</i>	rs438042	LCA	A=0.4305/2156	Chr.5: 80056029 on GRCh38	C__2418401_10	Funcionalmente testado	Transversion Substitution, Silent Mutation, Intragenic	A/T

<i>THBS4</i>	rs404375	LCA	G=0.4241/2124	Chr.5: 80052936 on GRCh38	C__2927418_20	Funcionalmente testado	Intron, Transition Substitution, Intragenic	A/G
<i>TNC</i>	rs2104772	LCA e MM	A=0.4810/2409	Chr.9: 115046506 on GRCh38	C__16182844_10	Validado	Intron, Transversion Substitution, Mis-sense Mutation, Intragenic	A/T
<i>TNC</i>	rs13321	LCA	C=0.3319/1662	Chr.9: 115030304 on GRCh38	C__8787735_1_	Validado	Transversion Substitution, Mis-sense Mutation, Intragenic	C/G
<i>TNC</i>	rs7035322	LCA	A=0.3674/1840	Chr.9: 115024894 on GRCh38	C__1413302_10	Funcionalmente testado	Transversion Substitution, Intron, Intragenic	A/C
<i>TNC</i>	rs1330363	LCA	C=0.4153/2080	Chr.9: 115051711 on GRCh38	C__11844394_10	Funcionalmente testado	Intron, transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>TNXB</i>	rs185819	LCA e MM	T=0.4137/2072	Chr.6: 32082290 on GRCh38	C__2412480_1_	Validado	Intergenic / Unknown, Transition Substitution	C/T
<i>TNXB</i>	rs1009382	LCA e MM	C=0.3039/1522	Chr.6: 32058330 on GRCh38	C__7515455_20	Funcionalmente testado	Mis-sense Mutation, Transition Substitution, Intron, ntragenic	C/T
<i>TNXB</i>	rs2894232	LCA	G=0.1827/915	Chr.6: 32043867 on GRCh38	C__27301835_10	Funcionalmente testado	Silent Mutation, Intron, Transition Substitution, Intragenic	A/G
<i>TNXB</i>	rs34214527	LCA	T=0.1212/607	Chr.6: 32046679 on GRCh38	C__27301843_10	Funcionalmente testado	Intron, Transition Substitution, Intragenic	C/T
<i>VEGFA</i>	rs699947	LCA	A=0.3245/1625	Chr.6: 43768652 on GRCh38	C__8311602_10	Funcionalmente testado	Transversion Substitution, Intergenic / Unknown, Intragenic	A/C
<i>VEGFA</i>	rs10434	LCA	A=0.3476/1741	Chr.6: 43785475 on GRCh38	C__1647360_20	Validado	UTR 3, Transition Substitution, Intragenic	A/G
<i>VEGFA</i>	rs2010963	LCA	C=0.3261/1633	Chr.6: 43770613 on GRCh38	C__8311614_10	Validado	Transversion Substitution, UTR 5, Intron, Intragenic	C/G
<i>VEGFC</i>	rs3775203	LCA	T=0.3802/1904	Chr.4: 176689877 on GRCh38	C__27514771_10	Funcionalmente testado	Transversion Substitution, Intron, Intragenic	G/T
<i>VEGFD</i>	rs6632528	LCA	C=0.3881/1465	Chr.X: 15384276 on GRCh38	C__27834564_10	Funcionalmente testado	UTR 5, Intron, Transition Substitution, Intragenic	C/T

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; MAF: Frequência do alelo raro; LCA: grupo de indivíduos com lesão do ligamento cruzado anterior; MM: grupo de indivíduos com lesão do menisco medial.

Durante a etapa de anelamento, as sondas ligam-se à sequência de DNA complementar desnaturada, pareando-se com os *primers forward* e *reverse*. Na etapa de amplificação do DNA, as sondas que estiverem ligadas de modo alelo-específico são degradadas pela ação de exonuclease 5'-3' da Taq DNA polimerase. O processo de clivagem libera o corante repórter da sonda, e dessa forma, a fluorescência causada por essa ação é detectada pelo termociclador para a análise em tempo real. A fluorescência detectada pelo equipamento é identificada, sendo possível a discriminação alélica de cada amostra (Figura 2)

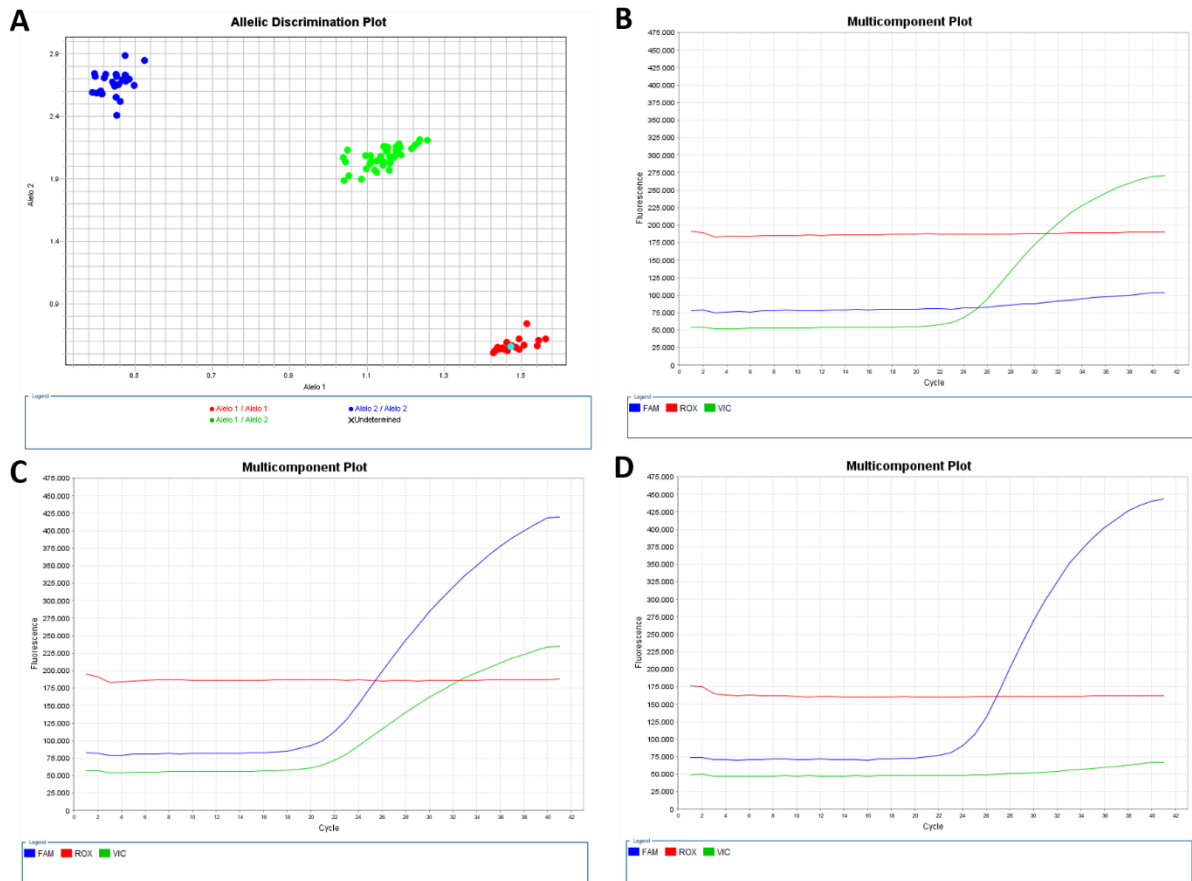


Figura 2. Discriminação Alélica. A) Representação de discriminação alélica geral (*Allelic Discrimination Plot*) de um grupo de amostras para determinado SNP. Observamos, em vermelho: amostras de indivíduos homocigotos para o alelo 1 (Alelo 1/Alelo 1), em azul: amostras de indivíduos homocigotos para o alelo 2 (Alelo 2/Alelo 2), e em verde: amostras de indivíduos heterocigotos (Alelo 1/Alelo 2). B, C e D: Representação da identificação genotípica de acordo com o reconhecimento da fluorescência (*Multicomponent Plot*): B) Homocigoto para alelo 1: reconhecimento de sonda com fluorocromo VIC (em verde); C) Heterocigoto: reconhecimento de sonda com fluorocromos VIC e FAM (em azul); D) Homocigoto para alelo 2: reconhecimento de sonda com fluorocromo FAM. A linha em vermelho representa a fluorescência passiva ROX.

Todas as reações foram realizadas em simplicatas para os SNPs estudados, foram utilizadas amostras com genótipos previamente conhecidos (controles positivos) para os genótipos: heterozigoto, homozigoto recessivo e homozigoto dominante de cada SNP avaliado e em cada placa uma reação por SNP foi avaliada sem amostra de DNA (controle negativo). Para cada reação de genotipagem, foram utilizadas 4,95 µL de *TaqMan*[®] Universal PCR MasterMix[®] (*Thermo Scientific*, EUA), 0,25 µL *TaqMan*[®] Pre-Designed SNP Genotyping Assays (*Thermo Scientific*, EUA) específico para cada polimorfismo estudado (Tabela 1) e 40 ng de DNA em um volume final de 10 µL.

A análise em tempo real foi realizada em um termociclador, no qual a reação foi incubada a 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 95 °C por 15 s e finalizando a 60 °C por 1 min.

4.5. Ancestralidade Molecular

A ancestralidade molecular das amostras de DNA de 92 amostras de LCA, 293 amostras controles de LCA, 63 amostras de MM e 308 controles para MM foram determinadas por processo de genotipagem de um conjunto de 61 polimorfismos do tipo inserção/deleção (INDELs) previamente descritos (60, 61). O procedimento foi realizado em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista Santos do Laboratório de Genética Humana e Médica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

As amostras foram genotipadas com a utilização do *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* (*Thermo Scientific*, EUA) e analisadas pelo *software GeneMapper v3.2* (*Thermo Scientific*, EUA). Para essa metodologia, as amostras foram genotipadas utilizando o *ABI PRISM Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) e os resultados foram analisados pelo *software Gene Mapper v3.2*. A escala *ABIGS LIZ-500* (*Applied Biosystems*) foi utilizada como referência para identificação dos INDELs. Para controle de qualidade, os padrões de tamanho conhecido foram incluídos em cada amostra (60).

4.6. Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para verificar a normalidade entre os grupos de estudo. O teste de qui-quadrado foi utilizado para comparar a frequência dos gêneros entre os grupos de casos e controles. O teste T foi utilizado para comparar a média de idades entre os grupos de casos e controles. A frequência alélica e genotípica de cada polimorfismo foi calculada para cada polimorfismo avaliado. Utilizamos o teste de qui-quadrado para investigar se os SNPs avaliados estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para investigar a associação dos casos e controles com cada SNP estudado utilizamos o teste de regressão logística. Para a análise utilizamos a relação de Odds Ratio (OR) e o intervalo de confiança correspondente a 95%. É importante informar que a regressão logística foi realizada utilizando-se como co-variáveis: idade, gênero, ancestralidade molecular e escore de Beigthon. Em todas as análises o genótipo homocigoto mais comum na população controle foi definido como variável categórica de referência.

Para avaliar a associação de cada SNP com o desenvolvimento de cada afecção estudada (LCA e MM) primeiramente consideramos o alelo raro como a e o alelo dominante como A, em seguida, adotamos a análise dos principais modelos de herança: 1) Modelo dominante (Aa + aa vs. AA), no qual a presença do alelo raro indica associação a doença, podendo ser considerado um fator de risco ou de proteção para o desenvolvimento da doença; 2) Modelo recessivo (aa vs. Aa + AA), no qual é necessário duas cópias do alelo raro para modificar o genótipo e ser considerado um fator de risco ou proteção para o desenvolvimento da doença; 3) Modelo aditivo, as amostras são codificadas como 1 (AA), 2 (Aa) e 3, (aa), nesse modelo, cada cópia de um alelo modifica o risco para o desenvolvimento da doença em proporção aditiva (escala de *log*), gerando um grau de associação com o desenvolvimento da doença de acordo com a presença do alelo de risco. Dessa forma, indivíduos com duas cópias para o alelo de risco (aa) possuem mais susceptibilidade para o desenvolvimento da doença quando comparado à um indivíduo com apenas uma cópia do alelo de risco (Aa), entretanto, esse último possui um risco aumentado para o desenvolvimento da doença quando comparado a um indivíduo sem o alelo de risco (AA)(62)

Para avaliar o desequilíbrio de ligação e a associação entre haplótipos dos SNPs estudados e desenvolvimento da lesão de LCA e MM utilizamos o software SNPstat (<https://www.snpstats.net/>) (63). Os dados foram ajustados por gênero, idade, ancestralidade molecular e escore de Beighton.

Para todas as análises o valor de $p = 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Com exceção do teste para avaliação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, no qual o valor de $p < 0,05$ determina que o SNP em análise está em desequilíbrio.

5 RESULTADOS

Os dados descritivos dos indivíduos avaliados foram os seguintes: 1) Indivíduos com lesão de LCA são 82% (75) do gênero masculino, 18% (17) do gênero feminino e com média de idade de 32,6 anos ($\pm 10,2$); 2) Indivíduos controles sem lesão de LCA são 77% (226) do gênero masculino, 23% (67) do gênero feminino e possuem média de idade igual a 33,7 ($\pm 12,98$); 3) Indivíduos com lesão de MM são 79% (49) do gênero masculino, 21% (13) do gênero feminino e possuem média de idade igual a 41,5 ($\pm 12,19$); e 4) Indivíduos controles sem lesão de MM são 83% (256) do gênero masculino, 17% (52) do gênero feminino e tem em média 36,1 ($\pm 13,88$) anos de idade.

5.1. Análise de polimorfismos em lesão de LCA

Foi observado que 12 dos 75 investigados SNPs não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, e portanto, os resultados não contribuem para indicar associação com a lesão do LCA (Tabela 2).

Tabela 2– Frequência genotípica em pacientes com lesão de ligamento cruzado anterior (LCA) e indivíduos controles sem lesão

Gene	Polimorfismo	Genótipo	Controle [N(%)]	LCA[N(%)]	EHW	Modelo Codominante (valor de p)	Modelo Dominante (valor de p)	Modelo Recessivo (valor de p)	Modelo Aditivo (valor de p)
ACAN	rs2351491	T/T	70 (25%)	20 (32,3%)	0,21	0,32	0,31	0,17	0,14
		C/T	130 (46,4%)	30 (48,4%)					
		C/C	80 (28,6%)	12 (19,4%)					
BGN	rs1126499	C/C	169 (60,6%)	33 (52,4%)	<0,0001*	0,61	0,33	0,44	0,36
		C/T	30 (10,8%)	6 (9,5%)					
		T/T	80 (28,7%)	24 (38,1%)					
	rs1042103	G/G	206 (73,6%)	41 (65,1%)	<0,0001*	0,48	0,24	0,25	0,23
		A/G	27 (9,6%)	5 (7,9%)					
		A/A	47 (16,8%)	17 (27%)					
COL1A1	rs1800012	C/C	214 (77%)	47 (77%)	0,14	0,83	0,83	0,54	0,71
		C/A	56 (20,1%)	13 (21,3%)					
		A/A	8 (2,9%)	1 (1,6%)					
	rs2075559	C/C	84 (30,2%)	15 (23,8%)	0,7	0,53	0,41	0,64	0,8
		C/G	131 (47,1%)	35 (55,6%)					
		G/G	63 (22,7%)	13 (20,6%)					
	rs2696247	A/A	204 (72,9%)	42 (66,7%)	1	0,5	0,24	0,78	0,27

		A/G	68 (24,3%)	19 (30,2%)						
		G/G	8 (2,9%)	2 (3,2%)						
COL1A2	rs42524	G/G	163 (66,3%)	33 (55%)	0,026*	0,37	0,18	0,98	0,31	
		G/C	68 (27,6%)	23 (38,3%)						
		C/C	15 (6,1%)	4 (6,7%)						
	rs411717	T/T	82 (29,3%)	13 (20,6%)	0,38	0,5	0,26	0,97	0,47	
		C/T	137 (48,9%)	36 (57,1%)						
		C/C	61 (21,8%)	14 (22,2%)						
	rs2521206	A/A	175 (62,5%)	35 (55,6%)	0,58	0,29	0,13	0,41	0,12	
		A/G	91 (32,5%)	24 (38,1%)						
		G/G	14 (5%)	4 (6,3%)						
COL2A1	rs3737548	G/G	144 (60,2%)	34 (56,7%)	0,88	0,58	0,66	0,3	0,44	
		G/T	84 (35,1%)	21 (35%)						
		T/T	11 (4,6%)	5 (8,3%)						
	rs2276455	G/G	85 (35,6%)	22 (36,7%)	0,38	0,99	0,97	0,89	0,96	
		G/A	119 (49,8%)	29 (48,3%)						
		A/A	35 (14,6%)	9 (15%)						
	rs954326	G/G	144 (51,4%)	40 (63,5%)	0,71	0,29	0,13	0,37	0,11	
		G/T	110 (39,3%)	20 (31,8%)						
		T/T	26 (9,3%)	3 (4,8%)						
	rs1635529	G/G	169 (60,4%)	46 (73%)	0,57	0,23	0,087	0,47	0,091	
		G/T	96 (34,3%)	15 (23,8%)						
		T/T	15 (5,4%)	2 (3,2%)						
COL3A1	rs3106796	A/A	106 (52,7%)	25 (40,3%)	0,28	0,17	0,1	0,63	0,25	
		A/G	81 (40,3%)	34 (54,8%)						
		G/G	14 (7%)	3 (4,8%)						
	rs1800255	G/G	159 (56,8%)	36 (58,1%)	0,53	0,86	0,8	0,59	0,67	
		A/G	99 (35,4%)	22 (35,5%)						
		A/A	22 (7,9%)	4 (6,5%)						
COL5A1	rs3196378	C/C	80 (28,9%)	13 (21,3%)	0,32	0,72	0,46	0,93	0,69	
		C/A	132 (47,6%)	32 (52,5%)						
		A/A	65 (23,5%)	16 (26,2%)						
	rs12722	C/C	74 (30,4%)	13 (20,6%)	0,18	0,21	0,17	0,58	0,62	
		C/T	108 (44,4%)	35 (55,6%)						
		T/T	61 (25,1%)	15 (23,8%)						
	rs13946	T/T	171 (61,1%)	35 (55,6%)	0,5	0,16	0,38	0,15	0,78	
		C/T	95 (33,9%)	27 (42,9%)						
		C/C	14 (5%)	1 (1,6%)						
	rs1134170	T/T	139 (49,8%)	31 (49,2%)	0,18	0,98	0,86	0,99	0,9	
		A/T	113 (40,5%)	26 (41,3%)						
		A/A	27 (9,7%)	6 (9,5%)						
	rs4504708	T/T	180 (64,3%)	40 (63,5%)	0,15	0,67	0,96	0,39	0,73	
		G/T	85 (30,4%)	21 (33,3%)						
		G/G	15 (5,4%)	2 (3,2%)						
COL12A1	rs240736	A/A	109 (44,5%)	30 (50%)	0,48	0,32	0,31	0,45	0,68	
		A/G	114 (46,5%)	22 (36,7%)						
		G/G	22 (9%)	8 (13,3%)						

	rs970547	T/T	131 (53,7%)	31 (50,8%)	0,35	0,69	0,6	0,41	0,44	
		T/C	93 (38,1%)	23 (37,7%)						
		C/C	20 (8,2%)	7 (11,5%)						
<i>COMP</i>	rs12327738	G/G	117 (57,9%)	34 (54%)	0,29	0,88	0,82	0,61	0,71	
		G/A	77 (38,1%)	25 (39,7%)						
		A/A	8 (4%)	4 (6,3%)						
		rs28494505	A/A	143 (60,3%)	36 (59%)	1	0,76	0,49	0,97	0,58
			A/G	80 (33,8%)	22 (36,1%)					
G/G	14 (5,9%)		3 (4,9%)							
<i>DCN</i>	rs35359254	C/C	200 (71,9%)	42 (67,7%)	0,59	0,29	0,22	0,54	0,38	
		C/G	68 (24,5%)	19 (30,6%)						
		G/G	10 (3,6%)	1 (1,6%)						
		rs516115	T/T	89 (31,9%)	23 (36,5%)	0,2	0,74	0,5	0,57	0,44
			C/T	144 (51,6%)	32 (50,8%)					
C/C	46 (16,5%)		8 (12,7%)							
<i>FGF2</i>	rs3138167	C/C	198 (70,7%)	47 (74,6%)	0,15	0,3	0,66	0,17	0,96	
		C/T	80 (28,6%)	14 (22,2%)						
		T/T	2 (0,7%)	2 (3,2%)						
		rs1476217	A/A	124 (44,4%)	28 (45,2%)	0,12	0,94	0,9	0,8	0,97
			A/C	113 (40,5%)	26 (41,9%)					
C/C	42 (15,1%)		8 (12,9%)							
<i>FGF3</i>	rs3747676	T/T	89 (31,9%)	18 (28,6%)	0,02*	0,45	0,96	0,24	0,45	
		C/T	126 (45,2%)	25 (39,7%)						
		C/C	64 (22,9%)	20 (31,8%)						
		rs308395	C/C	123 (43,9%)	34 (54%)	1	0,26	0,27	0,14	0,14
			C/G	123 (43,9%)	26 (41,3%)					
G/G	34 (12,1%)		3 (4,8%)							
<i>FGF5</i>	rs6838203	T/T	140 (50%)	30 (48,4%)	0,046*	0,79	0,64	0,53	0,53	
		A/T	111 (39,6%)	24 (38,7%)						
		A/A	29 (10,4%)	8 (12,9%)						
		rs3733336	A/A	128 (45,7%)	25 (40,3%)	0,67	0,16	0,51	0,056	0,15
			A/G	122 (43,6%)	24 (38,7%)					
G/G	30 (10,7%)		13 (21%)							
<i>FGFR1</i>	rs13317	T/T	173 (61,8%)	38 (60,3%)	0,16	0,94	0,92	0,77	0,97	
		C/T	88 (31,4%)	21 (33,3%)						
		C/C	19 (6,8%)	4 (6,3%)						
<i>FMOD</i>	rs7543148	T/T	118 (42,1%)	35 (56,5%)	0,75	0,19	0,12	0,19	0,07	
		C/T	128 (45,7%)	24 (38,7%)						
		C/C	34 (12,1%)	3 (4,8%)						
<i>FN1</i>	rs6728999	C/C	258 (93,1%)	63 (100%)	1	0,0043				
		C/T	19 (6,9%)	0 (0%)						
		rs11651	A/A	144 (51,4%)	29 (46,8%)	1	0,58	0,72	0,4	0,94
			A/G	110 (39,3%)	29 (46,8%)					
			G/G	26 (9,3%)	4 (6,5%)					
rs1263	G/G	94 (33,6%)	21 (33,9%)	0,92	0,24	0,88	0,11	0,48		
	A/G	131 (46,8%)	35 (56,5%)							

		A/A	55 (19,6%)	6 (9,7%)						
	rs940739	T/T	134 (47,9%)	27 (42,9%)	0,5	0,83	0,57	1	0,67	
		A/T	117 (41,8%)	29 (46%)						
<i>GHR</i>	rs4590183	A/A	29 (10,4%)	7 (11,1%)						
		T/T	144 (51,8%)	32 (51,6%)	0,81	0,67	0,93	0,4	0,79	
		C/T	111 (39,9%)	27 (43,5%)						
	rs6180	C/C	23 (8,3%)	3 (4,8%)						
		A/A	79 (28,2%)	14 (22,2%)	0,7	0,26	0,29	0,39	0,88	
		A/C	136 (48,6%)	37 (58,7%)						
<i>IGF1</i>	rs35767	C/C	65 (23,2%)	12 (19,1%)						
		G/G	151 (54,1%)	38 (60,3%)	0,3	0,36	0,42	0,18	0,26	
		A/G	113 (40,5%)	24 (38,1%)						
	rs6220	A/A	15 (5,4%)	1 (1,6%)						
		A/A	128 (45,9%)	32 (50,8%)	0,83	0,59	0,54	0,55	0,84	
		A/G	126 (45,2%)	24 (38,1%)						
	rs6214	G/G	25 (9%)	7 (11,1%)						
		C/C	81 (29,1%)	16 (26,2%)	0,12	0,86	0,64	0,67	0,58	
		C/T	152 (54,7%)	34 (55,7%)						
<i>LOX</i>	rs1800449	T/T	45 (16,2%)	11 (18%)						
		C/C	124 (61,4%)	44 (71%)	0,095	0,13	0,076	0,75	0,19	
		C/T	69 (34,2%)	14 (22,6%)						
	rs2288393	T/T	9 (4,5%)	4 (6,5%)						
		C/C	204 (72,9%)	43 (69,3%)	0,068	0,13	0,91	0,054	0,41	
		C/G	69 (24,6%)	14 (22,6%)						
<i>LUM</i>	rs2268578	G/G	7 (2,5%)	5 (8,1%)						
		G/G	153 (54,6%)	35 (56,5%)	0,37	0,57	0,9	0,33	0,8	
		A/G	106 (37,9%)	25 (40,3%)						
	rs243865	A/A	21 (7,5%)	2 (3,2%)						
<i>MMP2</i>		C/C	200 (71,4%)	46 (73%)	1	0,77	0,59	0,73	0,71	
		C/T	74 (26,4%)	15 (23,8%)						
		T/T	6 (2,1%)	2 (3,2%)						
	rs2285053	C/C	207 (73,9%)	47 (74,6%)	0,32	0,047	0,88	0,024*	0,48	
		C/T	68 (24,3%)	11 (17,5%)						
		T/T	5 (1,8%)	5 (7,9%)						
	rs243866	G/G	201 (71,8%)	44 (69,8%)	1	0,94	1	0,73	0,91	
		G/A	73 (26,1%)	17 (27%)						
		A/A	6 (2,1%)	2 (3,2%)						
<i>MMP3</i>	rs679620	C/C	99 (35,4%)	20 (31,8%)	0,24	0,49	0,91	0,29	0,58	
		C/T	129 (46,1%)	26 (41,3%)						
		T/T	52 (18,6%)	17 (27%)						
	rs522616	T/T	150 (53,6%)	34 (54%)	0,12	0,54	0,87	0,32	0,79	
		T/C	107 (38,2%)	26 (41,3%)						
		C/C	23 (8,2%)	3 (4,8%)						
<i>MMP9</i>	rs17576	A/A	117 (41,8%)	23 (36,5%)	0,67	0,47	0,42	0,52	0,79	
		A/G	127 (45,4%)	33 (52,4%)						
		G/G	36 (12,9%)	7 (11,1%)						
	rs17577	G/G	200 (71,4%)	44 (69,8%)	0,85	0,13	0,73	0,058	0,9	

		G/A	72 (25,7%)	19 (30,2%)					
		A/A	8 (2,9%)	0 (0%)					
<i>MMP13</i>	rs2252070	T/T	136 (48,6%)	36 (57,1%)	0,91	0,22	0,35	0,09	0,15
		T/C	114 (40,7%)	24 (38,1%)					
		C/C	30 (10,7%)	3 (4,8%)					
<i>PDGFB</i>	rs5757577	G/G	99 (35,4%)	20 (32,3%)	0,92	0,66	0,53	0,66	0,83
		A/G	137 (48,9%)	34 (54,8%)					
		A/A	44 (15,7%)	8 (12,9%)					
<i>PDGFC</i>	rs1425486	C/C	84 (30,1%)	20 (32,3%)	0,016*	0,41	0,85	0,2	0,39
		C/T	128 (45,9%)	24 (38,7%)					
		T/T	67 (24%)	18 (29%)					
<i>PDGFRB</i>	rs2229562	T/T	97 (34,6%)	24 (38,7%)	0,028*	0,37	0,34	0,53	0,78
		C/T	128 (45,7%)	24 (38,7%)					
		C/C	55 (19,6%)	14 (22,6%)					
<i>PLOD1</i>	rs2273285	G/G	175 (73,2%)	53 (86,9%)	0,019*	0,023	0,031	0,024	0,013
		G/T	53 (22,2%)	8 (13,1%)					
		T/T	11 (4,6%)	0 (0%)					
<i>PLOD2</i>	rs6710	C/C	74 (31,8%)	15 (25%)	0,0056*	0,012	0,42	0,019	0,4
		C/T	86 (36,9%)	35 (58,3%)					
		T/T	73 (31,3%)	10 (16,7%)					
<i>THBS4</i>	rs438042	T/T	96 (34,3%)	17 (27%)	1	0,58	0,29	0,76	0,38
		A/T	139 (49,6%)	35 (55,6%)					
		A/A	45 (16,1%)	11 (17,5%)					
	rs404375	A/A	100 (35,8%)	18 (29%)	0,55	0,61	0,34	0,96	0,5
		A/G	134 (48%)	34 (54,8%)					
		G/G	45 (16,1%)	10 (16,1%)					
<i>TNC</i>	rs2104772	T/T	72 (26%)	15 (24,6%)	0,5	0,71	0,84	0,48	0,77
		A/T	139 (50,2%)	34 (55,7%)					
		A/A	66 (23,8%)	12 (19,7%)					
	rs7035322	C/C	134 (47,9%)	27 (43,5%)	0,74	0,48	0,49	0,43	0,83
		A/C	119 (42,5%)	31 (50%)					
		A/A	27 (9,6%)	4 (6,5%)					
	rs13321	G/G	140 (50,2%)	29 (46,8%)	0,18	0,86	0,59	0,83	0,62
		C/G	107 (38,4%)	25 (40,3%)					
		C/C	32 (11,5%)	8 (12,9%)					
	rs1330363	T/T	105 (37,6%)	20 (31,8%)	0,77	0,2	0,39	0,22	0,98
		C/T	127 (45,5%)	36 (57,1%)					
		C/C	47 (16,9%)	7 (11,1%)					
<i>TNXB</i>	rs185819	C/C	67 (27,5%)	28 (45,9%)	0,59	0,036	0,016	0,095	0,01*
		C/T	122 (50%)	26 (42,6%)					
		T/T	55 (22,5%)	7 (11,5%)					
	rs1009382	T/T	141 (59,5%)	37 (61,7%)	0,18	0,85	0,86	0,64	0,97
		T/C	79 (33,3%)	19 (31,7%)					
		C/C	17 (7,2%)	4 (6,7%)					
	rs2894232	A/A	196 (70%)	37 (59,7%)	0,038*	0,11	0,19	0,062	0,087
		A/G	82 (29,3%)	22 (35,5%)					
		G/G	2 (0,7%)	3 (4,8%)					

	rs3421452								
	7	C/C	212 (76%)	52 (82,5%)	0,28	0,34	0,39	0,19	0,3
		C/T	63 (22,6%)	11 (17,5%)					
		T/T	4 (1,4%)	0 (0%)					
VEGFA	rs10434	G/G	102 (36,4%)	12 (19,1%)	0,76	0,023	0,0091*	0,97	0,093
		A/G	130 (46,4%)	40 (63,5%)					
		A/A	48 (17,1%)	11 (17,5%)					
	rs699947	C/C	120 (42,9%)	19 (30,6%)	0,008*	0,48	0,23	0,54	0,27
		A/C	111 (39,6%)	29 (46,8%)					
		A/A	49 (17,5%)	14 (22,6%)					
	rs2010963	G/G	118 (42,3%)	24 (38,7%)	0,92	0,13	0,41	0,12	0,92
		C/G	122 (43,7%)	34 (54,8%)					
		C/C	39 (14%)	4 (6,5%)					
VEGFC	rs3775203	G/G	107 (38,4%)	25 (40,3%)	0,76	0,22	0,81	0,12	0,53
		G/T	136 (48,8%)	25 (40,3%)					
		T/T	36 (12,9%)	12 (19,4%)					
VEGFD	rs6632528	T/T	185 (66,1%)	44 (71%)	<0,0001*	0,91	0,75	0,67	0,7
		C/T	27 (9,6%)	5 (8,1%)					
		C/C	68 (24,3%)	13 (21%)					

N: Numero amostral; LCA: indivíduos com lesão do ligamento cruzado anterior; EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Covariáveis: idade, gênero, ancestralidade e escore da Escala de Beighton para hiper mobilidade generalizada articular.

Observamos que o modelo recessivo para o polimorfismo rs2285053 do gene *MMP2* foi considerado estatisticamente significativo, indicando que indivíduos portadores do alelo recessivo em homozigose (TT) possuem maior risco de desenvolver lesão do LCA ($p= 0,024$; *Odds ratio* [OR]: 4,67; Intervalo de confiança [IC]: 1,28-17,05). O modelo aditivo mostrou-se estatisticamente significativo para o polimorfismo rs185819 do gene *TNXB*, indicando que a presença do alelo raro em homozigose determina maior proteção para o desenvolvimento de lesão de LCA ($p= 0,01$; OR: 0,58; IC: 0,38-0,89) No polimorfismo rs10434 do gene *VEGFA*, observamos que o modelo dominante foi associado ao risco de desenvolver lesão de LCA. A presença do alelo raro (A) confere risco para ruptura do LCA ($p= 0,00091$; OR: 2,36; IC: 1,19-4,66) (Tabela 2)

Avaliamos os haplótipos para os polimorfismos avaliados (Tabela 3). Observamos que o haplótipo C/G/G (rs rs411717/ rs2521206/ rs42524) para o gene *COL1A2* confere maior susceptibilidade em desenvolver lesão de LCA ($p=0,0084$; OR: 2,54; IC: 1,28 – 5,07). Indivíduos portadores do haplótipo C/T (rs2288393/ rs1800449) do gene *LOX* pode ser considerado como fator de proteção para o risco de desenvolver lesão de LCA ($p=0,027$; OR: 0,11; IC: 0,01 – 0,77). Também foi

observado que o haplótipo A/C/T/T (rs2894232/rs34214527/rs185819/rs1009382) da *TNXB* indica um fator de proteção para o desenvolvimento de ruptura do LCA (p=0,0054; OR: 0,29; IC: 0,13 – 0,69).

Tabela 3 – Análise de haplótipos para lesão do ligamento cruzado anterior

Gene	Combinações de polimorfismos associados				Frequência	OR (95% IC)	Valor de p	
<i>BGN</i>	rs1126499	rs1042103						
	1	C	G		0,5453	1	---	
	2	T	G		0,2214	1,03 (0,71 - 1,50)	0,87	
	3	T	A		0,1351	1,39 (0,92 - 2,10)	0,12	
	4	C	A		0,0981	1,06 (0,64 - 1,75)	0,81	
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,5								
<i>COL1A1</i>	rs3138167	rs2696247	rs1800012					
	1	C	A	C	0,4773	1	---	
	2	G	A	C	0,2459	1,00 (0,59 - 1,68)	1	
	3	G	G	C	0,1365	1,22 (0,66 - 2,27)	0,53	
	4	G	A	A	0,0781	0,62 (0,22 - 1,71)	0,35	
	5	C	A	A	0,0427	1,06 (0,30 - 3,81)	0,92	
	6	C	G	C	0,0123	0,85 (0,09 - 8,32)	0,89	
raro	*	*	*	0,0072	6,55 (0,46 - 93,03)	0,17		
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,84								
<i>COL1A2</i>	rs411717	rs2521206	rs42524					
	1	C	A	G	0,3207	1	---	
	2	T	A	G	0,2486	1,01 (0,53 - 1,92)	0,98	
	3	T	A	C	0,2061	1,63 (0,92 - 2,87)	0,095	
	4	C	G	G	0,1456	2,54 (1,28 - 5,07)	0,0084*	
	5	T	G	G	0,0745	0,45 (0,10 - 2,06)	0,3	
raro	*	*	*	0,0045	0,00 (-Inf - Inf)	1		
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,04								
<i>COL2A1</i>	rs954326	rs1635529	rs3737548	rs2276455				
	1	G	G	G	G	0,2872	1	---
	2	G	G	T	A	0,1786	0,79 (0,43 - 1,44)	0,44
	3	G	T	G	G	0,1674	0,56 (0,28 - 1,14)	0,11
	4	T	G	G	A	0,1433	0,67 (0,33 - 1,35)	0,26
	5	T	G	G	G	0,1272	0,53 (0,24 - 1,17)	0,11
	6	G	G	G	A	0,0339	1,17 (0,33 - 4,19)	0,81
	7	G	T	T	A	0,0265	0,59 (0,13 - 2,60)	0,48
	8	G	G	T	G	0,015	3,13 (0,63 - 15,50)	0,16
	9	G	T	G	A	0,0141	0,32 (0,00 - 80,91)	0,68
raro	*	*	*	*	0,0069	0,00 (-Inf - Inf)	1	
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,35								
<i>COL3A1</i>	rs1800255	rs3106796						
	1	G	A		0,4709	1	---	
	2	G	G		0,2759	1,31 (0,79 - 2,16)	0,3	
	3	A	A		0,2461	1,03 (0,63 - 1,67)	0,92	
raro	*	*		0,0071	0,00 (-Inf - Inf)	1		
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,73								
<i>COL5A1</i>	rs13946	rs1134170	rs4504708	rs3196378	rs12722			
	1	T	T	T	A	T	0,3998	1

2	T	T	T	C	C	0,1478	1,14 (0,61 - 2,14)	0,69
3	C	A	G	C	C	0,1431	0,86 (0,47 - 1,56)	0,62
4	T	A	T	C	C	0,0879	1,19 (0,52 - 2,72)	0,67
5	T	T	T	A	C	0,061	0,00 (-Inf - Inf)	1
6	T	T	T	C	T	0,0419	0,00 (-Inf - Inf)	1
7	C	A	T	C	C	0,0295	0,59 (0,12 - 3,01)	0,53
8	C	A	G	C	T	0,0222	0,33 (0,04 - 3,09)	0,33
9	T	T	G	C	C	0,0201	0,37 (0,03 - 4,61)	0,44
10	C	T	T	C	C	0,0134	6,28 (1,07 - 36,85)	0,043
raro	*	*	*	*	*	0,0334	1,58 (0,53 - 4,74)	0,42
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,00024								
<i>COL12A1</i>	rs240736	rs970547						
1	A	T				0,4722	1	---
2	G	T				0,249	0,86 (0,49 - 1,52)	0,6
3	A	C				0,2066	1,09 (0,61 - 1,97)	0,77
4	G	C				0,0721	1,21 (0,51 - 2,88)	0,66
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,83								
<i>COMP</i>	rs35359254	rs12327738	rs28494505					
1	C	G	A			0,5248	1	---
2	C	G	G			0,1576	1,35 (0,78 - 2,35)	0,28
3	C	A	A			0,1492	0,92 (0,47 - 1,80)	0,81
4	G	A	A			0,0783	1,95 (0,98 - 3,88)	0,058
5	G	G	G			0,0566	0,64 (0,16 - 2,61)	0,54
6	G	G	A			0,0194	0,85 (0,09 - 7,85)	0,88
raro	*	*	*			0,0142	0,00 (-Inf - Inf)	1
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,36								
<i>DCN</i>	rs516115	rs3138167						
1	T	C				0,582	1	---
2	C	C				0,2693	0,79 (0,49 - 1,29)	0,35
3	C	T				0,1466	0,93 (0,51 - 1,70)	0,81
raro	*	*				0,0021	0,00 (-Inf - Inf)	1
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,69								
<i>FGF2</i>	rs1476217	rs3747676						
1	A	C				0,466	1	---
2	C	T				0,3504	0,93 (0,61 - 1,40)	0,71
3	A	T				0,1836	0,72 (0,40 - 1,30)	0,28
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,55								
<i>FGF5</i>	rs6838203	rs3733336						
1	T	A				0,4622	1	---
2	T	G				0,2322	1,13 (0,67 - 1,92)	0,64
3	A	A				0,1986	0,92 (0,50 - 1,68)	0,79
4	A	G				0,107	1,74 (0,94 - 3,21)	0,078
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,34								
<i>FN1</i>	rs11651	rs1263	rs940739					
1	A	A	T			0,3176	1	---
2	A	G	T			0,2682	1,42 (0,82 - 2,46)	0,21
3	G	G	A			0,1948	1,30 (0,73 - 2,32)	0,38
4	A	A	A			0,0992	1,42 (0,62 - 3,22)	0,41
5	G	G	T			0,0922	0,98 (0,42 - 2,28)	0,96
6	A	G	A			0,0238	0,44 (0,06 - 3,32)	0,43
raro	*	*	*			0,0042	0,00 (-Inf - Inf)	1
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,68								
<i>GHR</i>	rs4590183	rs6180						
1	T	C				0,4607	1	---
2	C	A				0,2634	0,95 (0,58 - 1,56)	0,84
3	T	A				0,2599	0,98 (0,60 - 1,58)	0,92

	4	C	C		0,0159	0,72 (0,08 - 6,40)	0,77	
	Valor de p para associação de haplótipo global: 0,99							
<i>IGF1</i>		rs35767	rs6220	rs6214				
	1	G	A	C	0,3838	1	---	
	2	G	A	T	0,1944	1,41 (0,70 - 2,81)	0,33	
	3	G	G	C	0,1014	0,95 (0,41 - 2,19)	0,91	
	4	A	A	T	0,0954	0,59 (0,21 - 1,64)	0,31	
	5	A	G	T	0,0769	1,04 (0,38 - 2,82)	0,94	
	6	G	G	T	0,0735	1,31 (0,53 - 3,26)	0,56	
	7	A	G	C	0,0612	0,73 (0,21 - 2,61)	0,63	
	8	A	A	C	0,0134	2,35 (0,35 - 15,85)	0,38	
	Valor de p para associação de haplótipo global: 0,75							
<i>LOX</i>		rs2288393	rs1800449					
	1	C	C		0,7648	1	---	
	2	G	T		0,1228	1,19 (0,69 - 2,06)	0,54	
	3	C	T		0,0778	0,11 (0,01 - 0,77)	0,027*	
	4	G	C		0,0346	0,91 (0,33 - 2,56)	0,86	
	Valor de p para associação de haplótipo global: 0,0077							
<i>MMP2</i>		rs243865	rs2285053	rs243866				
	1	C	C	G	0,7008	1	---	
	2	T	C	A	0,1516	0,98 (0,56 - 1,73)	0,94	
	3	C	T	G	0,1433	1,19 (0,69 - 2,03)	0,53	
	raro	*	*	*	0,0044	8,55 (0,74 - 99,34)	0,087	
	Valor de p para associação de haplótipo global: 0,32							
<i>MMP3</i>		rs679620	rs522616					
	1	T	T		0,4271	1	---	
	2	C	T		0,3032	0,89 (0,55 - 1,44)	0,63	
	3	C	C		0,2697	0,90 (0,57 - 1,45)	0,68	
	Valor de p para associação de haplótipo global: 0,86							
<i>MMP9</i>		rs17576	rs17577					
	1	A	G		0,6226	1	---	
	2	G	G		0,2215	0,95 (0,59 - 1,52)	0,83	
	3	G	A		0,1371	1,20 (0,66 - 2,18)	0,55	
	4	A	A		0,0188	0,00 (-Inf - Inf)	1	
	Valor de p para associação de haplótipo global: 0,18							
<i>THBS4</i>		rs438042	rs404375					
	1	T	A		0,5831	1	---	
	2	A	G		0,4081	1,19 (0,79 - 1,79)	0,41	
	raro	*	*		0,0088	2,58 (0,43 - 15,60)	0,3	
	Valor de p para associação de haplótipo global: 0,49							
<i>TNC</i>		rs7035322	rs13321	rs1330363	rs2104772			
	1	C	G	T	A	0,3211	1	---
	2	A	C	C	T	0,2018	1,21 (0,70 - 2,06)	0,5
	3	C	G	C	T	0,1726	0,73 (0,39 - 1,36)	0,33
	4	C	G	T	T	0,1051	1,27 (0,66 - 2,44)	0,48
	5	C	C	T	A	0,0841	0,76 (0,34 - 1,69)	0,5
	6	A	G	T	A	0,0656	0,81 (0,30 - 2,15)	0,67
	7	A	C	T	T	0,0168	0,00 (-Inf - Inf)	1
	8	A	G	C	T	0,0105	0,00 (-Inf - Inf)	1
	raro	*	*	*	*	0,0224	0,47 (0,06 - 4,00)	0,49
	Valor de p para associação de haplótipo global: 0,32							
<i>TNXB</i>		rs2894232	rs34214527	rs185819	rs1009382			
	1	A	C	C	T	0,2872	1	---
	2	A	C	T	C	0,2269	0,69 (0,39 - 1,24)	0,22
	3	A	C	T	T	0,2006	0,29 (0,13 - 0,69)	0,0054*
	4	G	C	C	T	0,1524	1,02 (0,55 - 1,91)	0,94

5	A	T	C	T	0,0999	0,48 (0,20 - 1,16)	0,11
raro	*	*	*	*	0,033	1,21 (0,29 - 5,14)	0,79
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,014							
<i>VEGFA</i>	rs10434	rs699947	rs2010963				
1	G	A	G	0,2114	1	---	
2	G	C	C	0,2086	1,56 (0,74 - 3,31)	0,25	
3	A	A	G	0,1776	2,07 (0,98 - 4,36)	0,058	
4	G	C	G	0,1601	0,67 (0,26 - 1,74)	0,41	
5	A	C	C	0,1468	0,79 (0,32 - 1,94)	0,61	
6	A	C	G	0,0954	1,69 (0,74 - 3,85)	0,22	
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,16							

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; Inf: frequência menor que 0.

5.2. Análise de polimorfismos em lesão de MM

Dos 23 polimorfismos avaliados para lesão de MM, 2 estão fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4) e dessa forma os resultados desses polimorfismos não contribuem para a associação com o desenvolvimento da lesão de MM.. Observamos que o modelo recessivo para o alelo raro (G) para o polimorfismo rs3106796 do gene *COL3A1* mostrou-se estatisticamente significativo, indicando um aumento no risco de desenvolver a lesão de MM ($p=0,004$; OR: 5,18; IC: 1,70 – 15,78). No modelo dominante para o polimorfismo rs17576 do *MMP9*, observamos que a presença do alelo raro (G) confere proteção para o desenvolvimento da lesão do menisco medial ($p=0,041$; OR: 0,50; IC: 0,26-0,98) (Tabela 4).

Tabela 4– Frequência genotípica em pacientes com lesão do menisco medial (MM) e indivíduos controles sem lesão

Gene	Polimorfismo	Genótipo	Controle [N(%)]	MM [N(%)]	EHW	Modelo Codominante (valor de p)	Modelo Dominante (valor de p)	Modelo Recessivo (valor de p)	Modelo Aditivo (valor de p)
<i>COL1A1</i>	rs1800012	C/C	184 (75,4%)	30 (68,2%)	1	0,24	0,64	0,13	0,94
		C/A	54 (22,1%)	14 (31,8%)					
		A/A	6 (2,5%)	0 (0%)					
<i>COL1A2</i>	rs42524	G/G	138 (66,7%)	27 (61,4%)	0,33	0,12	0,26	0,21	0,66
		G/C	57 (27,5%)	16 (36,4%)					
		C/C	12 (5,8%)	1 (2,3%)					
<i>COL2A1</i>	rs3737548	G/G	125 (61,3%)	29 (65,9%)	0,48	0,33	0,81	0,19	0,74
		G/T	69 (33,8%)	11 (25%)					
		T/T	10 (4,9%)	4 (9,1%)					
	rs2276455	G/G	71 (34,8%)	21 (47,7%)	1	0,32	0,19	0,83	0,4
		G/A	102 (50%)	17 (38,6%)					
		A/A	31 (15,2%)	6 (13,6%)					
<i>COL3A1</i>	rs1800255	G/G	93 (54,1%)	30 (68,2%)	0,043*	0,21	0,08	0,4	0,091
		G/A	61 (35,5%)	11 (25%)					
		A/A	18 (10,5%)	3 (6,8%)					
	rs3106796	A/A	84 (50%)	17 (38,6%)	1	0,011	0,069	0,0041	0,007*

		A/G	73 (43,5%)	17 (38,6%)					
		G/G	11 (6,5%)	10 (22,7%)					
<i>COMP</i>	rs12327738	G/G	102 (60,4%)	23 (52,3%)	0,19	0,74	0,58	0,5	0,48
		G/A	62 (36,7%)	18 (40,9%)					
		A/A	5 (3%)	3 (6,8%)					
	rs28494505	A/A	116 (57,4%)	27 (61,4%)	0,87	0,74	0,88	0,48	0,92
		A/G	72 (35,6%)	16 (36,4%)					
		G/G	14 (6,9%)	1 (2,3%)					
<i>FN1</i>	rs6728999	C/C	231 (95,1%)	42 (95,5%)	1	0,85			
		C/T	12 (4,9%)	2 (4,5%)					
<i>LOX</i>	rs1800449	C/C	104 (60,8%)	28 (63,6%)	0,26	0,3	0,22	0,62	0,44
		C/T	59 (34,5%)	12 (27,3%)					
		T/T	8 (4,7%)	4 (9,1%)					
<i>MMP2</i>	rs243865	C/C	181 (72,4%)	35 (77,8%)	0,3	0,23	0,66	0,16	0,87
		C/T	62 (24,8%)	7 (15,6%)					
		T/T	7 (2,8%)	3 (6,7%)					
	rs2285053	C/C	184 (73,6%)	32 (71,1%)	0,65	0,93	0,71	0,95	0,73
		C/T	62 (24,8%)	12 (26,7%)					
		T/T	4 (1,6%)	1 (2,2%)					
	rs243866	G/G	182 (72,8%)	35 (77,8%)	0,21	0,23	0,68	0,16	0,85
		G/A	61 (24,4%)	7 (15,6%)					
		A/A	7 (2,8%)	3 (6,7%)					
<i>MMP3</i>	rs679620	C/C	90 (36%)	21 (46,7%)	0,91	0,25	0,099	0,43	0,12
		C/T	118 (47,2%)	18 (40%)					
		T/T	42 (16,8%)	6 (13,3%)					
	rs522616	T/T	118 (47,2%)	25 (55,6%)	0,37	0,53	0,32	0,42	0,26
		T/C	105 (42%)	17 (37,8%)					
		C/C	27 (10,8%)	3 (6,7%)					
<i>MMP9</i>	rs17576	A/A	99 (39,6%)	25 (55,6%)	1	0,12	0,041*	0,56	0,075
		A/G	119 (47,6%)	15 (33,3%)					
		G/G	32 (12,8%)	5 (11,1%)					
	rs17577	G/G	179 (71,6%)	37 (82,2%)	1	0,25	0,1	0,9	0,14
		G/A	66 (26,4%)	7 (15,6%)					
		A/A	5 (2%)	1 (2,2%)					
<i>MMP13</i>	rs2252070	T/T	126 (50,4%)	17 (40,5%)	0,44	0,24	0,24	0,12	0,11
		T/C	97 (38,8%)	17 (40,5%)					
		C/C	27 (10,8%)	8 (19,1%)					
<i>PLOD1</i>	rs2273285	G/G	154 (75,5%)	38 (86,4%)	0,18	0,17	0,12	0,17	0,084
		G/T	43 (21,1%)	6 (13,6%)					
		T/T	7 (3,4%)	0 (0%)					
<i>PLOD2</i>	rs6710	T/T	59 (29,4%)	17 (39,5%)	0,019*	0,47	0,22	0,59	0,29
		C/T	85 (42,3%)	16 (37,2%)					
		C/C	57 (28,4%)	10 (23,3%)					
<i>TNC</i>	rs2104772	T/T	64 (26,3%)	9 (20,4%)	0,32	0,78	0,49	0,95	0,64
		A/T	123 (50,6%)	25 (56,8%)					
		A/A	56 (23,1%)	10 (22,7%)					
<i>TNXB</i>	rs185819	C/C	59 (28,8%)	14 (31,8%)	0,9	0,71	0,51	0,5	0,41
		C/T	103 (50,2%)	23 (52,3%)					
		T/T	43 (21%)	7 (15,9%)					
	rs1009382	T/T	116 (57,4%)	28 (65,1%)	0,86	0,14	0,065	0,26	0,047*
		T/C	74 (36,6%)	14 (32,6%)					
		C/C	12 (5,9%)	1 (2,3%)					

N: Numero amostral; LCA: indivíduos com lesão do ligamento cruzado anterior; EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Covariáveis: idade, gênero, ancestralidade e escore da Escala de Beighton para hiper mobilidade generalizada articular

Ao avaliar os haplótipos (Tabela 5), observamos que o haplótipo G/G (rs1800255/rs3106796) do gene *COL3A1* encontrou-se estatisticamente significativo, conferindo aumento do risco para desenvolver a lesão de MM ($p=0,02$; OR: 2,04; IC: 1,12 - 3,71). Também observamos que indivíduos com haplótipo C/T (rs679620/rs522616) no gene *MMP3* alta susceptibilidade para desenvolver a lesão de MM ($p=0,013$; OR: 2,07; IC: 1,17 - 3,65).

Tabela 5 – Análise de haplótipos para lesão do menisco medial

Gene	Combinações de polimorfismos associados		Frequência	OR (95% IC)	Valor de p		
<i>COL2A1</i>	rs3737548	rs2276455					
	1	G	G	0,5963	1	---	
	2	T	A	0,2031	0,94 (0,50 - 1,78)	0,85	
	3	G	A	0,186	0,67 (0,32 - 1,39)	0,28	
	4	T	G	0,0146	2,03 (0,31 - 13,38)	0,46	
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,58							
<i>COL3A1</i>	rs1800255	rs3106796					
	1	G	A	0,4288	1	---	
	2	G	G	0,3065	2,04 (1,12 - 3,71)	0,02 *	
	3	A	A	0,2601	0,83 (0,43 - 1,59)	0,57	
	raro	*	*	0,0045	0,00 (-Inf - Inf)	1	
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,024 *							
<i>COL12A1</i>	rs240736	rs970547					
	1	A	T	0,4705	1	---	
	2	G	T	0,2592	1,70 (0,88 - 3,30)	0,12	
	3	A	C	0,2115	1,47 (0,73 - 2,95)	0,28	
	4	G	C	0,0588	1,20 (0,35 - 4,12)	0,77	
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,44							
<i>TNXB</i>	rs185819	rs1009382					
	1	C	T	0,5404	1	---	
	2	T	C	0,2322	0,57 (0,28 - 1,17)	0,13	
	3	T	T	0,2217	1,00 (0,56 - 1,79)	1	
	raro	*	*	0,0056	0,00 (-Inf - Inf)	1	
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,32							
<i>COMP</i>	rs12327738	rs28494505					
	1	G	A	0,5406	1	---	
	2	G	G	0,2318	1,12 (0,56 - 2,24)	0,75	
	3	A	A	0,2185	1,28 (0,67 - 2,46)	0,46	
	raro	*	*	0,009	0,00 (-Inf - Inf)	1	
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,81							
<i>MMP2</i>	rs243865	rs2285053	rs243866				
	1	C	C	G	0,7068	1	---
	2	T	C	A	0,1492	1,08 (0,57 - 2,05)	0,81
	3	C	T	G	0,1424	1,13 (0,59 - 2,19)	0,71
	raro	*	*	*	0,0017	0,00 (-Inf - Inf)	1
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,95							
<i>MMP3</i>	rs679620	rs522616					
	1	T	T	0,3932	1	---	
	2	C	C	0,3085	1,03 (0,57 - 1,88)	0,92	
	3	C	T	0,2983	2,07 (1,17 - 3,65)	0,013 *	
Valor de p para associação de haplótipo global: 0,02 *							

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; Inf: frequência menor que 0.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Malila e colaboradores encontraram associação de um polimorfismo localizado na região promotora do gene *MMP3*. A presença do genótipo 5A+ no polimorfismo da região promotora -1612 indicou alta susceptibilidade para desenvolvimento de lesão do LCA em pacientes que praticavam esportes de contato (64). A *MMP3*, assim como as outras metaloproteinase, tem como função realizar a degradação enzimática de colágeno e auxiliam na quebra de outros componentes estruturais presentes na MEC do tecido musculoesquelético, tal como proteoglicanos, fibronectina, entre outros (65).

Proteases como a metaloproteinases realizam a remodelação da MEC, quando estão em equilíbrio influenciam na morfogênese e desenvolvimento normal do tecido no qual se encontram. Entretanto, quando há uma alteração na homeostasia as metaloproteinase podem atuar de forma exacerbada no processo de regeneração, uma vez que possui um papel importante no processo anti-inflamatório. Sabe-se que as metaloproteinases, assim como seus inibidores são controladas por fatores hormonais, ação de citocina antiinflamatórias e fatores de crescimento. O processo anti-inflamatório que ocorre durante a lesão do joelho ocorre com finalidade de promover a regeneração do tecido lesionado, de forma que as metaloproteinases e seus inibidores podem remodelar o ambiente celular e influenciar nos processos de invasão e migração celular(65, 66)

Nós observamos que indivíduos que possuem genótipo homocigoto para o alelo raro (TT) da variante rs2285053 do gene *MMP2* possuem mais chances de desenvolver ruptura do LCA ($p=0,024$). Da mesma maneira, ao analisar os haplótipos encontramos associação do haplótipo C/T (rs679620/ rs522616) no gene *MMP3*, indicando alto risco de desenvolver lesão do menisco medial ($p=0,013$) Portanto, podemos considerar que indivíduos com genótipo TT para rs2285053 (*MMP2*) ou haplotipo C/T para *MMP3* possuem a atividade dessas metaloproteinase mais sensível do que os demais genótipos levando a uma ação relativamente aumentada. A MEC do LCA e MM pode gerar desequilíbrio entre os processos de síntese e degradação levando a um aumento do risco em desenvolver a lesão do LCA quando há presença do genótipo TT (rs2285053) ou em desenvolver lesão de MM na presença do haplótipo C/T para *MMP3*. Adicionalmente, a possível atividade

aumentada da MMP2 e MMP3 pode influenciar no aumento do processo anti-inflamatório, levando a um maior processo degenerativo.

Ao avaliar o polimorfismo rs17576 do *MMP9* para desenvolvimento de lesão do MM, observamos que a presença do alelo raro (G) indica um fator de proteção para a ocorrência da lesão ($p=0,041$). Portanto, a presença do alelo raro seja em homozigose ou heterozigose mostra que a atividade da MMP9 possui uma degradação equilibrada das fibras de colágeno, proteoglicanos e outros compostos da MEC, garantindo regulação apropriada para a manutenção da MEC, e resultando em um tecido com a capacidade estrutural necessária para suprir as necessidades biomecânicas do MM.

A TNXB é uma glicoproteína presente na MEC e membro da família das tenascinas X. É responsável por regular a fibrilogenese do colágeno (67) e estão envolvidas nos processos de morfogênese, migração e crescimento celular de diversos tecidos (68). Em humanos, TNX é expresso abundantemente em todos os tecidos conectivos, incluindo tendões e ligamentos, e um fragmento de 140kDa está presente no soro (69) TNX é importante para a deposição apropriada das fibras de colágeno na derme. Mutações de TNX, resultando em deficiência dessa proteína, causam uma forma autossômica recessiva de EDS, que é uma doença do tecido conjuntivo caracterizada por hiper mobilidade de articulações, hiperextensão da pele e fragilidade de tecidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7148>). Luxações ou subluxações também podem ser observadas em indivíduos com EDS devido à deficiência de TNX (70). TNX também é candidato à síndrome da hiper mobilidade articular benigna, na qual foi previamente descrita uma redução dos níveis séricos de TNX (69). Estudos com fibroblastos de camundongos nulos para TNX sugerem que essa proteína tem um papel fundamental na regulação da deposição de fibrilas de colágenos, independentemente da síntese de colágenos e fibrilogenese (71).

Nakahara e colaboradores avaliaram células de ACL de pacientes com osteoartrite, e observaram que existia uma expressão reduzida de *TNXB* (72), eles sugerem que citocinas inflamatórias regulam a ação da TNXB resultando em desorientação das fibras de colágenos e podendo causar processos de degeneração, infiltração de células inflamatórias, neovascularização ou metaplasia dos condrócitos podendo levar a uma ruptura degenerativa (72) Até o presente

momento não existem estudos avaliando polimorfismos e a associação com afecções musculoesqueléticas como ruptura de LCA ou MM.

Na presente tese observamos que o polimorfismo rs185819 da *TNXB* está associado à proteção para o desenvolvimento de lesão do LCA. Ou seja, indivíduos com duas cópias do alelo raro (T) possuem menor susceptibilidade em desenvolver a ruptura do LCA ($p=0,01$) quando comparados a indivíduos com somente uma cópia do alelo raro. Da mesma forma, esses últimos possuem menos chances de desenvolver lesão do LCA quando comparados a indivíduos sem o alelo raro, caracterizando o modelo aditivo de hereditariedade. Também observamos que o haplótipo A/C/T/T - rs2894232, rs34214527, rs185819 e rs1009382, respectivamente - para *TNXB* pode ser considerado como fator de proteção para o desenvolvimento de lesão de LCA ($p=0,0054$). Dessa forma, podemos considerar que a presença do alelo T (rs185819) e o haplótipo A/C/T/T para *TNXB* podem estar associados na melhor disposição das fibras de colágenos, garantindo melhor estruturação do LCA.

A lisil oxidase (LOX) é uma enzima envolvida no processo de estabilização de fibrilas de colágeno, responsável pelo primeiro passo da formação de cross-links. LOX catalisa a formação de lisil aldeído (alisina) e hidroxilisil aldeído (hidroxialisina). Todas as reações seguintes para a formação de cross-links envolvendo moléculas de colágeno ocorrem espontaneamente em virtude do alinhamento dessas moléculas. LOX também catalisa a desaminação oxidativa de resíduos peptidil-lisina de precursores de elastina (73, 74).

A ligação cruzada entre essas proteínas de MEC por LOX é essencial para a formação de colágeno insolúvel e fibras elásticas e para o desenvolvimento normal de mamíferos (73, 74). A atividade de LOX é essencial para a manutenção das características elásticas e a resistência tênsil de tecidos conectivos, pulmonar e do sistema cardiovascular, entre outros (75). A expressão e a atividade de LOX são alteradas em muitas doenças humanas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e fibrose (76). Entretanto, até o momento não existe nenhum estudo investigando a associação com o desenvolvimento de lesões ortopédicas como LCA e MM. Nosso grupo não encontrou associação de polimorfismos do LOX com o desenvolvimento das lesões estudadas, entretanto, ao avaliar os haplótipos pudemos observar que o haplótipo C/T - rs2288393 e rs1800449, respectivamente – pode ser considerado

como fator de proteção para o desenvolvimento de lesão do LCA. Dessa forma, sua atuação pode estar associada a uma ação enzimática equilibrada, contribuindo para a manutenção da MEC, e resultando em um tecido com características elásticas e de resistência adequada para a funcionalidade do LCA.

A estrutura básica de ligamentos e tendões é a fibrila de colágeno. As fibrilas consistem predominantemente em colágeno tipo I (COL1). COL1 é um heterotrímero constituído de duas cadeias $\alpha 1$ (COL1A1) e uma $\alpha 2$ (COL1A2). As fibrilas também contêm colágeno tipo III (COL3) e V (COL5). COL3 é um homotrímero constituído por três cadeias de $\alpha 1$ (COL3A1). Outros colágenos, glicoproteínas e proteoglicanos podem estar associados às fibrilas(38). Em ligamentos, a proporção de COL3 é geralmente maior, variando de 12 a 40% de alguns ligamentos. A quantidade de COL3 contribui para a elasticidade do tecido e varia de acordo com o ligamento (77). Nessas estruturas, em recém-nascidos, as fibras constituídas de COL3 são maleáveis e elásticas. Com o passar das décadas, as células produtoras de colágeno sintetizam menos COL3 e progressivamente mais COL1. COL1 apresenta grupos sulfato que fazem ligações do tipo cross-link (ligação cruzada) e pontes com outros filamentos colágenos, tornando o tecido menos elástico e mais estável. A alteração na razão da produção de COL1 e COL3 está altamente relacionada à idade cronológica (78). Sendo assim, maior expressão de COL3 em ligamentos de indivíduos adultos pode estar relacionada à hipermobilidade ou instabilidade de articulações e, dessa forma, ao risco de lesões.

Alguns polimorfismos em genes de colágeno foram previamente associados ao risco de lesões ortopédicas. Posthumus e colaboradores (34) demonstram que um polimorfismo de COL1A1 (rs180012) era fator protetor para lesão do LCA em uma população caucasóide da África do Sul. Por outro lado, em outro estudo, Posthumus e colaboradores (35) não identificaram associação entre esse polimorfismo e ruptura de tendão de Aquiles. Os autores descreveram que o genótipo TT 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.

Diferente dos demais genes avaliados, o estudo de polimorfismos de genes que codificam o colágeno tem sido muito investigado na última década.

Recentemente Em 2015, O'Connel e colaboradores encontraram associação entre *COL5A1* (rs12722) e *COL12A1* (rs970547) na população sul-africana com diagnóstico de lesão de LCA (79). Recentemente, Stepień-Słodkowska e colaboradores observaram associação de risco reduzida em indivíduos portadores do genótipo GG do *COL1A1* (rs1800012) (80).

Ao avaliar nossa população, diferente dos demais estudos, nós não encontramos associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos citados anteriormente. Entretanto, observamos que o haplótipo C/G/G - rs rs411717, rs2521206 e rs42524 – no gene da *COL1A2* indica maior chance de desenvolver lesão do LCA ($p=0,0084$).

Ao avaliar o grupo de lesão do menisco medial, pudemos observar que o genótipo GG para o polimorfismo rs3106796 do gene *COL3A1* indica um aumento de susceptibilidade para desenvolver a lesão ($p=0,004$). Quando o haplótipo foi avaliado, verificamos que a combinação G/G - rs1800255 e rs3106796, respectivamente – para o *COL3A1* confere aumento do risco em desenvolver a lesão de MM ($p=0,02$). Dessa forma, podemos considerar que a presença do alelo raro está influenciando na composição das fibrilas, principal componente da MEC do LCA e composta principalmente por colágeno.

É importante informar que as análises de polimorfismos e de haplotipos foram ajustadas por idade, gênero, ancestralidade molecular e dados de hiper mobilidade generalizada articular. Como a população de estudo, brasileira, é de origem miscigenada a investigação de marcadores genéticos são necessários para melhor categorização dos grupos. Da mesma maneira os indivíduos avaliados também foram pareados com os dados de HGA, já que sabe-se que é um fator de risco para ambas as lesões. Adicionalmente, vale ressaltar que o N amostral no presente estudo é baixo para considerar representativo da nossa população. É necessário aumentar o número amostral para se ter uma melhor investigação e validação da frequência genotípica e alélica.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Os polimorfismos rs2285053 (*MMP2*) e rs10434 (*VEGFA*) estão associados ao risco de desenvolver lesão do ligamento cruzado anterior. O polimorfismo rs185819 (*TNXB*) está associado a lesão do ligamento cruzado anterior como fator de proteção. Ao avaliar os haplótipos, encontramos associação dos haplótipos: C/G/G (rs rs411717/ rs2521206/ rs42524) no gene *COL1A2*, indicando risco para a lesão; C/T (rs2288393/ rs1800449) do gene *LOX* e A/C/T/T (rs2894232/rs34214527/rs185819/rs1009382) da *TNXB* considerados fator de proteção para o desenvolvimento da doença.

Ao avaliar o grupo com e sem lesão de menisco medial, observamos que os polimorfismos rs3106796 do gene *COL3A1* confere aumento do risco em desenvolver a lesão, enquanto o polimorfismo rs17576 do *MMP9* indica proteção para o desenvolvimento da lesão de menisco medial. Os haplotipos G/G (rs1800255/rs3106796) do gene *COL3A1* e C/T (rs679620/rs522616) no gene *MMP3* estão relacionados com o risco de desenvolver lesão do menisco medial.

Observamos que polimorfismos da MEC estão associados com a lesão de ligamento cruzado anterior e lesão do menisco medial.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Flandry F, Hommel G. Normal anatomy and biomechanics of the knee. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2011;19(2):82-92.
2. Marieswaran M, Jain I, Garg B, Sharma V, Kalyanasundaram D. A Review on Biomechanics of Anterior Cruciate Ligament and Materials for Reconstruction. *Appl Bionics Biomech.* 2018;2018:4657824.
3. Chivers MD, Howitt SD. Anatomy and physical examination of the knee menisci: a narrative review of the orthopedic literature. *J Can Chiropr Assoc.* 2009;53(4):319-33.
4. Cordle AC, Williams DD, Andrews CL. The Postoperative Meniscus: Anatomical, Operative, and Imaging Considerations. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2018;22(4):398-412.
5. Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of human knee menisci: structure, composition, and function. *Sports Health.* 2012;4(4):340-51.
6. Hughes G, Watkins J. A risk-factor model for anterior cruciate ligament injury. *Sports Med.* 2006;36(5):411-28.
7. Kim S, Bosque J, Meehan JP, Jamali A, Marder R. Increase in outpatient knee arthroscopy in the United States: a comparison of National Surveys of Ambulatory Surgery, 1996 and 2006. *J Bone Joint Surg Am.* 2011;93(11):994-1000.
8. Singh N. International Epidemiology of Anterior Cruciate Ligament Injuries. *Orthopedic Research Online Journal.* 2018;1(5).
9. Bahr R, Krosshaug T. Understanding injury mechanisms: a key component of preventing injuries in sport. *Br J Sports Med.* 2005;39(6):324-9.
10. Smith BA, Livesay GA, Woo SL. Biology and biomechanics of the anterior cruciate ligament. *Clin Sports Med.* 1993;12(4):637-70.
11. Daniel DM, Stone ML, Dobson BE, Fithian DC, Rossman DJ, Kaufman KR. Fate of the ACL-injured patient. A prospective outcome study. *The American journal of sports medicine.* 1994;22(5):632-44.
12. Hewett TE, Lynch TR, Myer GD, Ford KR, Gwin RC, Heidt RS, Jr. Multiple risk factors related to familial predisposition to anterior cruciate ligament injury: fraternal twin sisters with anterior cruciate ligament ruptures. *Br J Sports Med.* 2010;44(12):848-55.
13. Thelin N, Holmberg S, Thelin A. Knee injuries account for the sports-related increased risk of knee osteoarthritis. *Scand J Med Sci Sports.* 2006;16(5):329-33.
14. Molloy MG, Molloy CB. Contact sport and osteoarthritis. *Br J Sports Med.* 2011;45(4):275-7.
15. Nicholson S, Dickman K, Maradiegue A. Reducing premature osteoarthritis in the adolescent through appropriate screening. *Journal of Pediatric Nursing.* 2009;24(1):69-74.
16. Griffin LY, Albohm MJ, Arendt EA, Bahr R, Beynonn BD, Demaio M, et al. Understanding and preventing noncontact anterior cruciate ligament injuries: a review of the Hunt Valley II meeting, January 2005. *Am J Sports Med.* 2006;34(9):1512-32.
17. Boden BP, Dean GS, Feagin JA, Jr., Garrett WE, Jr. Mechanisms of anterior cruciate ligament injury. *Orthopedics.* 2000;23(6):573-8.
18. FIFA. F-MARC - Football for Health 15 years of F-MARC Research and Education 1994 - 2009: FIFA; [Available from:

<http://pt.fifa.com/mm/document/footballdevelopment/medical/01/47/88/15/15yearsofresearchandeducation.pdf>.

19. Lin CF, Gross M, Ji C, Padua D, Weinhold P, Garrett WE, et al. A stochastic biomechanical model for risk and risk factors of non-contact anterior cruciate ligament injuries. *J Biomech.* 2009;42(4):418-23.
20. Renstrom P, Ljungqvist A, Arendt E, Beynon B, Fukubayashi T, Garrett W, et al. Non-contact ACL injuries in female athletes: an International Olympic Committee current concepts statement. *Br J Sports Med.* 2008;42(6):394-412.
21. Trojian TH, Collins S. The anterior cruciate ligament tear rate varies by race in professional Women's basketball. *Am J Sports Med.* 2006;34(6):895-8.
22. Russek LN. Hypermobility syndrome. *Phys Ther.* 1999;79(6):591-9.
23. von Porat A, Roos EM, Roos H. High prevalence of osteoarthritis 14 years after an anterior cruciate ligament tear in male soccer players: a study of radiographic and patient relevant outcomes. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(3):269-73.
24. Scher DL, Owens BD, Sturdivant RX, Wolf JM. Incidence of joint hypermobility syndrome in a military population: impact of gender and race. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(7):1790-5.
25. Kramer LC, Denegar CR, Buckley WE, Hertel J. Factors associated with anterior cruciate ligament injury: history in female athletes. *J Sports Med Phys Fitness.* 2007;47(4):446-54.
26. Uhorchak JM, Scoville CR, Williams GN, Arciero RA, St Pierre P, Taylor DC. Risk factors associated with noncontact injury of the anterior cruciate ligament: a prospective four-year evaluation of 859 West Point cadets. *Am J Sports Med.* 2003;31(6):831-42.
27. Ramesh R, Von Arx O, Azzopardi T, Schranz PJ. The risk of anterior cruciate ligament rupture with generalised joint laxity. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(6):800-3.
28. Kim SJ, Chang JH, Kim TW, Jo SB, Oh KS. Anterior cruciate ligament reconstruction with use of a single or double-bundle technique in patients with generalized ligamentous laxity. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(2):257-62.
29. Kim SJ, Kim TE, Lee DH, Oh KS. Anterior cruciate ligament reconstruction in patients who have excessive joint laxity. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90(4):735-41.
30. Lambert KL. The syndrome of the torn anterior cruciate ligament. *Adv Orthop Surg.* 1984;7:304-14.
31. Harner CD, Paulos LE, Greenwald AE, Rosenberg TD, Cooley VC. Detailed analysis of patients with bilateral anterior cruciate ligament injuries. *Am J Sports Med.* 1994;22(1):37-43.
32. Flynn RK, Pedersen CL, Birmingham TB, Kirkley A, Jackowski D, Fowler PJ. The familial predisposition toward tearing the anterior cruciate ligament: a case control study. *Am J Sports Med.* 2005;33(1):23-8.
33. 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(12):2432-6.
34. Posthumus M, September AV, Keegan M, O'Cuinneagain D, Van der Merwe W, Schwellnus MP, et al. Genetic risk factors for anterior cruciate ligament ruptures: COL1A1 gene variant. *Br J Sports Med.* 2009;43(5):352-6.
35. 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. *J Sci Med Sport.* 2009;12(1):184-9.

36. Posthumus M, September AV, O'Cuinneagain D, van der Merwe W, Schwellnus MP, Collins M. The COL5A1 gene is associated with increased risk of anterior cruciate ligament ruptures in female participants. *Am J Sports Med.* 2009;37(11):2234-40.
37. September AV, Cook J, Handley CJ, van der Merwe L, Schwellnus MP, Collins M. Variants within the COL5A1 gene are associated with Achilles tendinopathy in two populations. *Br J Sports Med.* 2009;43(5):357-65.
38. Collins M, Posthumus M, Schwellnus MP. The COL1A1 gene and acute soft tissue ruptures. *Br J Sports Med.* 2010;44(14):1063-4.
39. Baker LA, Kirkpatrick B, Rosa GJ, Gianola D, Valente B, Sumner JP, et al. Genome-wide association analysis in dogs implicates 99 loci as risk variants for anterior cruciate ligament rupture. *PLoS One.* 2017;12(4):e0173810.
40. Kim SK, Roos TR, Roos AK, Kleimeyer JP, Ahmed MA, Goodlin GT, et al. Genome-wide association screens for Achilles tendon and ACL tears and tendinopathy. *PLoS One.* 2017;12(3):e0170422.
41. Rahim M, Mannion S, Klug B, Hobbs H, van der Merwe W, Posthumus M, et al. Modulators of the extracellular matrix and risk of anterior cruciate ligament ruptures. *J Sci Med Sport.* 2017;20(2):152-8.
42. John R, Prabhakar S, Dhillon MS, Anand A, Minhas G. Association of ACL tears and single nucleotide polymorphisms in the collagen 12 A1 gene in the Indian population - a preliminary case-control study. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2016;6(2):253-7.
43. Young K, Samiric T, Feller J, Cook J. Extracellular matrix content of ruptured anterior cruciate ligament tissue. *Knee.* 2011;18(4):242-6.
44. Englund M, Roos EM, Roos HP, Lohmander LS. Patient-relevant outcomes fourteen years after meniscectomy: influence of type of meniscal tear and size of resection. *Rheumatology (Oxford).* 2001;40(6):631-9.
45. Majewski M, Susanne H, Klaus S. Epidemiology of athletic knee injuries: A 10-year study. *Knee.* 2006;13(3):184-8.
46. Baker BE, Peckham AC, Puppato F, Sanborn JC. Review of meniscal injury and associated sports. *Am J Sports Med.* 1985;13(1):1-4.
47. Garrett WE, Jr., Swiontkowski MF, Weinstein JN, Callaghan J, Rosier RN, Berry DJ, et al. American Board of Orthopaedic Surgery Practice of the Orthopaedic Surgeon: Part-II, certification examination case mix. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(3):660-7.
48. Krause WR, Pope MH, Johnson RJ, Wilder DG. Mechanical changes in the knee after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am.* 1976;58(5):599-604.
49. Baratz ME, Fu FH, Mengato R. Meniscal tears: the effect of meniscectomy and of repair on intraarticular contact areas and stress in the human knee. A preliminary report. *Am J Sports Med.* 1986;14(4):270-5.
50. Kruger-Franke M, Siebert CH, Kugler A, Trouillier HH, Rosemeyer B. Late results after arthroscopic partial medial meniscectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1999;7(2):81-4.
51. Radin EL. Factors influencing the progression of osteoarthritis. In: Ewing JW, editor. *Articular Cartilage and Knee Joint Function.* Nova Iorque: Raven Press; 1990. p. 301-9.
52. Blain E, Duance V. Meniscus. In: HUTSON M, SPEED C, editors. *Sports injuries: Oxford; 2010.* p. 45-53.

53. Poulsen MR, Johnson DL. Meniscal injuries in the young, athletically active patient. *Phys Sportsmed*. 2011;39(1):123-30.
54. Baker P, Coggon D, Reading I, Barrett D, McLaren M, Cooper C. Sports injury, occupational physical activity, joint laxity, and meniscal damage. *J Rheumatol*. 2002;29(3):557-63.
55. Englund M, Felson DT, Guermazi A, Roemer FW, Wang K, Crema MD, et al. Risk factors for medial meniscal pathology on knee MRI in older US adults: a multicentre prospective cohort study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(10):1733-9.
56. Kuikka PI, Pihlajamaki HK, Mattila VM. Knee injuries related to sports in young adult males during military service - Incidence and risk factors. *Scand J Med Sci Sports*. 2011.
57. Yeh PC, Starkey C, Lombardo S, Vitti G, Kharrazi FD. Epidemiology of Isolated Meniscal Injury and Its Effect on Performance in Athletes From the National Basketball Association. *Am J Sports Med*. 2011.
58. Sturup J, Iversen BF, Lauersen N. Abnormal knee mobility and meniscal injury. *Acta Orthop Scand*. 1987;58(6):655-7.
59. Alentorn-Geli E, Myer GD, Silvers HJ, Samitier G, Romero D, Lázaro-Haro C, et al. Prevention of non-contact anterior cruciate ligament injuries in soccer players. Part 1: Mechanisms of injury and underlying risk factors. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009;17(7):705-29.
60. Ramos BR, D'Elia MP, Amador MA, Santos NP, Santos SE, da Cruz Castelli E, et al. Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. *Genetica*. 2016;144(3):259-65.
61. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat*. 2010;31(2):184-90.
62. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. [Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies]. *Gac Sanit*. 2005;19(4):333-41.
63. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-9.
64. Malila S, Yuktanandana P, Saowaprut S, Jiamjarasrangsi W, Honsawek S. Association between matrix metalloproteinase-3 polymorphism and anterior cruciate ligament ruptures. *Genet Mol Res*. 2011;10(4):4158-65.
65. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet*. 1990;6(4):121-5.
66. Yamamoto K, Murphy G, Troeberg L. Extracellular regulation of metalloproteinases. *Matrix Biol*. 2015;44-46:255-63.
67. Minamitani T, Ikuta T, Saito Y, Takebe G, Sato M, Sawa H, et al. Modulation of collagen fibrillogenesis by tenascin-X and type VI collagen. *Exp Cell Res*. 2004;298(1):305-15.
68. Tochigi M, Zhang X, Ohashi J, Hibino H, Otowa T, Rogers M, et al. Association study between the TNXB locus and schizophrenia in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007;144B(3):305-9.
69. Zweers MC, Kucharekova M, Schalkwijk J. Tenascin-X: a candidate gene for benign joint hypermobility syndrome and hypermobility type Ehlers-Danlos syndrome? *Ann Rheum Dis*. 2005;64(3):504-5.

70. 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.
71. 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.
72. Nakahara H, Hasegawa A, Otabe K, Ayabe F, Matsukawa T, Onizuka N, et al. Transcription factor Mohawk and the pathogenesis of human anterior cruciate ligament degradation. *Arthritis Rheum.* 2013;65(8):2081-9.
73. Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol.* 1998;16(7):387-98.
74. Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;70:1-32.
75. Ma L, Song H, Zhang M, Zhang D. Lysyl Oxidase G473A Polymorphism Is Associated with Increased Risk of Coronary Artery Diseases. *DNA Cell Biol.* 2011.
76. Fogelgren B, Polgar N, Szauter KM, Ujfaludi Z, Laczko R, Fong KS, et al. Cellular fibronectin binds to lysyl oxidase with high affinity and is critical for its proteolytic activation. *J Biol Chem.* 2005;280(26):24690-7.
77. RILEY G. Tendon and ligament biochemistry and pathology. *Sports injuries.* 2010:3-39.
78. Hayes K, Callanan M, Walton J, Paxinos A, Murrell GA. Shoulder instability: management and rehabilitation. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2002;32(10):497-509.
79. O'Connell K, Knight H, Ficek K, Leonska-Duniec A, Maciejewska-Karlowska A, Sawczuk M, et al. Interactions between collagen gene variants and risk of anterior cruciate ligament rupture. *Eur J Sport Sci.* 2015;15(4):341-50.
80. Stepien-Słodkowska M, Ficek K, Zietek P, Kaczmarczyk M, Lubkowska W, Szark-Eckardt M, et al. Is the Combination of COL1A1 Gene Polymorphisms a Marker of Injury Risk? *J Sport Rehabil.* 2017;26(3):234-8.

Anexo 1



Registro da Disciplina de Genética: _____

Protocolo de Pesquisa: Departamento de Ortopedia e Traumatologia **QUESTIONÁRIO GERAL**

Médico responsável: _____ **Data da coleta:** _____

Nome do paciente: _____

Sexo: Masculino Feminino **Data de nascimento:** _____

Endereço atual: _____

País: _____ **Estado:** _____ **Cidade:** _____

E-mails: _____

Telefones para contato: _____

Telefones e nome de parente para contato: _____

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

Naturalidade: País: _____ Estado: _____ Cidade: _____

Local de nascimento da mãe: _____ **pai:** _____

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

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

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

Dominância: Braços: Destro Canhoto Ambidestro **Pernas:** Destro Canhoto Ambidestro

PROFISSÃO:

Aposentado; Atividade anterior: _____ Manual Não manual

Trabalha; Profissão: _____ Manual Não manual

ATIVIDADE FÍSICA/ESPORTE

Pratica atividade física: Sim Não

Atividade física/esporte principal (1): Qual? _____ Atual Passado **Frequência (por semana):** _____

Idade em que começou a praticar: _____ **Nº. de anos praticando:** _____

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

Idade em que começou a praticar: _____ **Nº. de anos praticando:** _____

Observações (posição, nível, etc): _____

COMORBIDADES CLÍNICAS:

Osteoartrose Osteoartrite Osteoporose primária Osteoporose secundária Osteopenia

Fraturas osteoporóticas Capsulite adesiva (ombro congelado) Ruptura do manguito rotador Luxação

do ombro Tendinopatia do manguito rotador Lesão do ligamento cruzado anterior Lesão do menisco

Luxação da patela Outra lesão de articulação: _____

Contratura de Dupuytren Asma/bronquite Fibromialgia Acidente cerebrovascular Marcapasso

Hipertensão arterial sistêmica Infarto agudo do miocárdio Outra cardiopatia: _____

Hipertrigliceridemia (triglicérides elevados) Dislipidemia (colesterol elevado) Litíase renal (pedras no

rim) Insuficiência renal Hiperuricemia (ácido úrico elevado)

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? _____ Quando? _____ Tratamento: _____

Artrite reumatoide ou Outras doenças do tecido conectivo ou reumatológicas (reumatismo) – Qual? _____ Tratamento: _____

Outras/especificações: _____

FRATURAS PRÉVIAS DURANTE A VIDA ADULTA (fraturas osteoporóticas):

Onde (lugar do corpo): _____ Direito Esquerdo

Se mais que uma lesão, detalhar: _____

Quando ocorreu? _____

Mecanismo de lesão: Traumático Não traumático **Qual?** _____

Tratamento: Conservador Osteosíntese Artroplastia Quando? _____

DENSITOMETRIA ÓSSEA (g/m²):

Não avaliado T-escore: _____ g/m² Outro: _____ g/m²; Método usado: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

Alguém na família (avós, pais, irmãos, tios, etc) tem ou teve alguma fratura osteoporótica? Sim Não

Não sabe informar

Quem (especifique o grau de parentesco da pessoa e se do lado paterno ou materno)?: _____

Ombro Punho Quadril Vértebra

Se mais de um parente, descreva: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES DE LESÕES DE ARTICULAÇÃO

Alguém na família (avós, pais, irmãos, tios, etc) tem ou teve alguma lesão de articulação?

Sim Não Não sabe informar

Quem (especifique o grau de parentesco da pessoa e se do lado paterno ou materno)?: _____

Lesão de ligamento cruzado anterior Lesão de menisco Luxação da patela luxação do ombro

Lesão do manguito rotador Capsulite adesiva (ombro congelado) Outra: _____

Se mais de um parente, descreva: _____

MENOPAUSA: Não Sim; idade: _____ Reposição hormonal: Atual Passado Não fez

REMÉDIOS DE USO CONTÍNUO

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

USO DE MEDICAMENTOS PARA OSTEOPOROSE:

Reposição de cálcio:

Não Sim, uso no passado Sim, uso atual Dose: _____ Tempo de tratamento: _____

Reposição ou complementação com vitamina D:

Não Sim, uso no passado Sim, uso atual Dose: _____ Tempo de tratamento: _____

Bifosfonato:

Não Sim, uso no passado Sim, uso atual Qual? _____ Dose: _____

Tempo de tratamento: _____

Outros: Qual? _____ Dose: _____ Tempo de tratamento: _____

USO DE GLICOCORTICÓIDES:

Não Sim, uso no passado Sim, uso atual Dose: _____ Tempo de tratamento: _____ meses

USO DE ANABOLIZANTES: Não Sim – Qual? _____

TABAGISMO: Nunca fumou Parou Tabagista

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

Se parou: Há quanto tempo parou de fumar? _____

ETILISMO: Nunca bebeu Bebia, porém parou Bebe socialmente Bebe rotineiramente < 3 doses/dia

Bebe rotineiramente ≥ 3 doses/dia. Uma dose equivale a um copo padrão de cerveja (285 ml), uma medida de drinque (30 ml), um copo médio de vinho (120 ml) ou uma medida de aperitivo (60 ml).

Anexo 2

Registro da Disciplina de Genética: _____



Protocolo de Pesquisa

AVALIAÇÃO DE HIPERFROUXIDÃO LIGAMENTAR GENERALIZADA

Nome do paciente: _____

Registro hospitalar: _____

Critérios de Beighton



1. Hiperextensão dos cotovelos a mais de 10°.

Cotovelo direito: Positivo Negativo

Cotovelo esquerdo: Positivo Negativo

2. Tocar de forma passiva o polegar no antebraço com flexão do pulso

Polegar direito: Positivo Negativo

Polegar esquerdo: Positivo Negativo

3. Extensão passiva dos dedos ou extensão da quinta falange a mais de 90°.

Dedos da mão direita: Positivo Negativo

Dedos da mão esquerda: Positivo Negativo

4. Hiperextensão dos joelhos a mais de 10°.

Joelho direito: Positivo Negativo

Joelho esquerdo: Positivo Negativo

5. Tocar o chão com as palmas da mão ao se abaixar sem dobrar os joelhos.

Positivo Negativo

Score de Beighton: _____ (para cada item "positivo" assinalado acima, é computado um ponto)

Hiperfrouxidão ligamentar generalizada é considerada positiva para pacientes com *score* de Beighton maior ou igual a 4.

Apêndice 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Variantes genéticas e o risco de lesão do ligamento cruzado anterior

Pesquisador: LEONOR ISABEL CASILLA LOYOLA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 1

CAAE: 42017714.6.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 965.530

Data da Relatoria: 11/03/2015

Apresentação do Projeto:

A etiologia das doenças ortopédicas relacionadas à prática esportiva ainda não é conhecida, sabe-se, porém, que essas afecções possuem um componente genético.

Fatores genéticos como, por exemplo, polimorfismos de DNA, podem estar associados ao risco dessa lesão. Polimorfismos de genes envolvidos, principalmente, na estrutura e no remodelamento de matriz extracelular serão avaliados para identificar variantes genéticas associadas ao risco da afecção estudada. Em nosso conhecimento, há poucos estudos na literatura que avaliaram o polimorfismo genético na lesão do ligamento cruzado anterior.

Recentemente, alguns estudos associaram variantes genéticas polimórficas em genes de colágenos, em genes que codificam proteoglicanos e em genes da família de MMP ao risco de lesão de LCA.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos de genes de matriz extracelular entre pacientes com lesão do LCA e indivíduos controles, além de verificar se a população estudada encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Investigar a associação dos polimorfismos estudados com variáveis clínicas, como gênero, idade,

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

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

Continuação do Parecer: 965.530

ancestralidade, IMC, presença e tratamento de lesões prévias, histórico familiar, presença de hábito tabagista e etílico, uso de anabolizantes e de medicamentos contínuos, presença de HGA e variáveis associadas, comorbidades clínicas e variáveis ortopédicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco Mínimo, desconforto leve no procedimento de coleta de sangue e obtenção de fragmento/tecido durante a cirurgia de rotina

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo com o objetivo acadêmico de Mestrado, vinculado ao Departamento/Disciplina ORTOPEDIA e TRAUMATOLOGIA da Unifesp, Campus São Paulo, com orientação do prof. Moises Cohen

Metodologia Casuística

Para a avaliação clínica e análise de polimorfismo, serão avaliados 400 pacientes com lesão do LCA comprovados 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. Serão incluídos pacientes de ambos os gêneros e com idade entre 18 e 55 anos (com esqueleto maduro). Adicionalmente, como grupo controle, serão recrutados 800 indivíduos saudáveis (voluntários) sem lesão do ligamento cruzado anterior, pareados por gênero e idade. Esses indivíduos também serão recrutados no Hospital São Paulo, incluindo pacientes provenientes do Pronto-Socorro e dos Ambulatórios.

Coleta de material biológico Sangue periférico De cada indivíduo serão coletados 10 mL de sangue periférico em tubo com EDTA para a extração de DNA.

Análises de polimorfismos de DNA As amostras de DNA de sangue serão purificadas utilizando-se Genra Puregene Blood Kit (Qiagen, Alemanha). Os genótipos serão determinados pela técnica de PCR em tempo real com ensaios TaqMan (Applied Biosystems, EUA). Para a genotipagem pelo sistema TaqMan serão utilizadas sondas específicas para cada variante genética (cada alelo) marcadas com fluorocromos diferentes, além de primers específicos flanqueando a região de interesse. Com base no sinal fluorescente detectado no aparelho termociclador com análise

em tempo real (Applied Biosystems, EUA), é determinado o genótipo. Análise estatística Os genótipos e frequências alélicas e o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg serão avaliados usando-se o teste do Qui-quadrado. O valor de $p <$

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

Continuação do Parecer: 965.530

0,05 será considerado estatisticamente significativo. O tamanho do efeito será determinado para cada análise de acordo com o teste estatístico realizado. A análise estatística será realizada por meio do programa SPSS 18.0. Para as análises de desequilíbrio de ligação e associação de haplótipos com morbidades, serão utilizados os programas Linkage disequilibrium analyzer e Haploview.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos obrigatórios apresentados (FOLHA DE ROSTO, PROJETO DE PESQUISA E TCLE)
Apresentado o orçamento financeiro do estudo no valor de R\$ 40 293,00 com financiamento FAPESP

Recomendações:

Apresentar aprovação FAPESP, assim que for obtida por NOTIFICAÇÃO na plataforma brasil

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios semestrais (no caso de estudos pertencentes à área temática especial) e anuais (em todas as outras situações). É também obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

SAO PAULO, 26 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

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

Apêndice 2

Termo de consentimento livre e esclarecido

AFECÇÕES ORTOPÉDICAS RELACIONADAS À PRÁTICA ESPORTIVA: ASPECTOS CLÍNICOS, 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 pesquisa no Hospital São Paulo – Hospital Universitário UNIFESP –, está desenvolvendo uma pesquisa, cujo objetivo é identificar alterações genéticas e moleculares no quadro clínico do paciente para detectar variantes associadas ao risco de lesão e conhecer melhor os mecanismos causadores das lesões ortopédicas e, conseqüentemente, oferecer novas possibilidades de tratamento e de determinação do prognóstico.

O participante responderá a questionários que frequentemente fazem parte da avaliação clínica. Esse procedimento levará aproximadamente 30 minutos.

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.

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

Os indivíduos que aceitarem participar do projeto de pesquisa como integrantes do grupo controle, ou seja, não portadores das afecções ortopédicas relacionadas a prática esportiva a serem avaliadas, não terão o seu tratamento clínico ou cirúrgico modificado devido à participação do presente estudo.

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 traumáticas de joelho. 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 Prof. Dr. Moisés Cohen e Dr.^a Mariana Leal, que podem ser encontrados na UNIFESP, rua Botucatu, 740, Departamento de Ortopedia e Traumatologia, telefone (011)5571-6621. Se houver alguma consideração a fazer, ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da UNIFESP, rua Botucatu, 572, 1.º andar, cj 14, 5571-1062, fax 5539-7162, e-mail: cepunifesp@epm.br.

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

