



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM DIAGNÓSTICO GENÉTICO E MOLECULAR

Estudo de associação entre o polimorfismo VNTR do gene do agregano
e a osteoartrose coxofemural

Dissertação de Mestrado
apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em
Diagnóstico Genético e
Molecular.

Paulo Cezar Schütz

Orientador: Dr. Daniel Simon

Canoas

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular Humana do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil, subvencionado pela Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por apoiarem meus sonhos e em homenagem póstuma a minha mãe quando do início deste projeto.

À minha esposa Marcia, pelo apoio dado neste período e em praticamente boa parte da minha vida e ainda pelo maior presente que poderia ter me dado: Carolina. Que este projeto sirva de exemplo e incentivo a carreira da nossa filha.

À minha prima Rosane e à minha tia Marlene que também de alguma forma contribuíram na conclusão deste feito.

A todos os funcionários do Banco de Sangue do Hospital Cristo Redentor e do Laboratório Santa Cruz (em Santa Cruz do Sul), que muito se esforçaram nas coletas de sangue que contribuíram para a conclusão deste feito.

Ao meu orientador, em especial, Dr. Daniel Simon, pelo profissionalismo, seriedade, por acreditar e tornar concreto este projeto.

A todos os demais professores do mestrado profissional do PPG Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil e que repassaram seus conhecimentos.

Aos pacientes, sujeitos da pesquisa, que se doaram para o progresso da ciência.

ÍNDICE

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Epidemiologia e impacto social da osteoartrose.....	8
Anatomia da cartilagem articular.....	10
Quadro clínico e laboratorial da osteoartrose.....	12
Propriedades biomecânicas e bioquímicas da cartilagem articular.....	13
Mudanças na cartilagem osteoartrítica.....	14
Bases genéticas da osteoartrose.....	16
Justificativa e objetivos.....	19
<i>Artigo: Associação entre o polimorfismo VNTR do gene do agrecano e a osteoartrose coxofemural</i>	<i>20</i>
Introdução.....	20
Material e métodos.....	21
Indivíduos estudados.....	21
Análises genéticas.....	21
Análises estatísticas.....	22
Resultados.....	22
Discussão.....	25
Conclusão e perspectivas.....	29
Referências bibliográficas.....	30
Anexo 1.....	36
Anexo 2.....	39

Resumo

As queixas decorrentes da osteoartrose coxofemural (coxartrose) são freqüentes nos consultórios médicos e trazem grandes conseqüências sócio-econômicas devido a sua alta prevalência. As alterações observadas na cartilagem articular impedem, com a idade, que esta resista ao estresse diário de pressão e tensão sobre a superfície articular. Dentre as causas mais comuns de coxartrose, as de origem idiopática representam no mínimo 50%. Fatores mecânicos também estão envolvidos na patogênese da osteoartrose e são gerados por incongruência articular, frouxidão ligamentar, instabilidade articular, fraqueza muscular, necrose avascular, lesão direta da cartilagem e propriocepção afetada em adição a microtraumatismos bem como causas constitucionais como peso físico aumentado, hipotireoidismo e menopausa. Alterações nos proteoglicanos e conseqüente redução do conteúdo aquoso têm sido observadas na fisiopatologia da osteoartrose de um modo geral. Estudos anteriores revelam que um polimorfismo de número variável de repetições *in tandem* no gene do agrecano pode estar relacionado à doença degenerativa da cartilagem articular e à osteoartrose. O polimorfismo, localizado no éxon 12, resulta em variações no tamanho do domínio de ligação do agrecano ao sulfato de condroitina. O presente estudo teve como objetivo analisar o polimorfismo do gene agrecano em uma amostra de indivíduos brasileiros caucasianos portadores de coxartrose idiopática. Foram incluídos no estudo 102 indivíduos adultos, sem relação de parentesco, sendo 45 homens e 57 mulheres, portadores de osteoartrose coxofemural idiopática avaliados por exame radiográfico. No grupo controle foram incluídos indivíduos saudáveis, totalizando 151 indivíduos, sendo 62 homens e 89 mulheres. O polimorfismo foi genotipado através da reação em cadeia da polimerase seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida. No grupo de pacientes foram observados 15 alelos e 29 genótipos, com 22,1% dos indivíduos sendo homozigotos. No grupo controle foram observados 15 alelos e 30 genótipos, com 27,8% dos indivíduos sendo homozigotos. Foi observada diferença estatisticamente significativa nas freqüências dos alelos com menos de 23 repetições entre os pacientes e o grupo controle (freqüência nos pacientes: 10,3%; freqüência nos controles: 4,6%; $p = 0,014$; $OR=2,36$, $CI\ 95\% 1,11-5,15$). Em conclusão, o presente estudo encontrou uma associação estatisticamente significativa entre a coxartrose e alelos do gene do agrecano, indicando que o polimorfismo do agrecano pode ser um fator de risco para a coxartrose.

Abstract

Complaints due to hip osteoarthritis (coxarthrosis) are frequent in the clinical offices and bring great social and economic consequences due to its high prevalence. The changes observed in articular cartilage during a life time hinder it to resist the pressure and tension of daily stress on the articular surface. Among the most common causes of hip osteoarthritis, the ones with idiopathic origin represent at least 50%. Mechanical factors are also involved in the pathogenesis of osteoarthritis and are generated by joint incongruity, ligamentous laxity, joint instability, muscle weakness, avascular necrosis, injury to cartilage, affected proprioception, in addition to microtraumas and physical causes as weight increased, hypothyroidism and menopause. Changes in proteoglycans and subsequent reduction of water content have been observed in the osteoarthritis pathophysiology. Previous studies showed that a polymorphism of variable number of tandem repeats in the gene of aggrecan may be related to degenerative disease of articular cartilage and osteoarthritis. The polymorphism, located at exon 12, results in changes in the chondroitin sulphate domain of aggrecan gene. The present study aimed to analyze the aggrecan polymorphism gene in a sample of Brazilian Caucasian patients with idiopathic hip osteoarthritis. One hundred and two adults with no kinship relation (45 men and 57 women), carriers of idiopathic hip osteoarthritis supported by radiographic evaluation, were included in the study. In the control group, healthy subjects were included, totalizing 151 subjects (62 men and 89 women). The polymorphism was genotyped by polymerase chain reaction followed by electrophoresis on polyacrylamide gel. In the patient group, 15 alleles and 29 genotypes were observed, with 22% of the individuals being homozygous. In the control group, 15 alleles and 30 genotypes were observed, with 28% of the individuals being homozygous. Significant statistically difference was found between the allele frequencies of patients and control subjects when compared alleles fewer than 23 repetitions between patients and control group (frequency in patients: 10.3%; frequency in controls: 4.6%; $p = 0.014$, OR = 2.36, CI 95% 1.11-5.15). In conclusion, the present study found a significant statistically association between hip osteoarthritis and alleles of the aggrecan gene, suggesting that the aggrecan polymorphism could be a risk factor for hip osteoarthritis.

Introdução

A osteoartrose ou osteoartrite (OA) é comumente definida como uma condição degenerativa dos idosos, acelerada por certos fatores externos como traumatismo e obesidade (Wollheim, 2003). Tradicionalmente a OA tem sido vista como uma condição degenerativa e não inflamatória e por isso foi mais frequentemente chamada de “osteoartrose”. Sinais clássicos de inflamação estão ausentes, entretanto são comuns edema sinovial, sensibilidade e derrame articular, bem como, indicativos clínicos de inflamação. Embora sejam eventos transitórios no curso da OA acredita-se que estes eventos possam ser uma resposta secundária a injúria tecidual e não um evento patogênico primário (Hedbom e Häuselmann, 2002).

A osteoartrose é a doença mais comum das articulações e está entre os problemas sintomáticos de saúde mais frequentes entre pessoas de meia idade e idosos (Simon, 1999). A OA não representa uma entidade única, mas um grupo de doenças distintas de diferentes etiologias, porém com similar biologia, morfologia e achados clínicos. O processo da doença não afeta somente a cartilagem articular, mas envolve a articulação por inteiro, incluindo o osso subcondral, ligamentos, cápsula, membrana sinovial e músculos periarticulares. As alterações da cartilagem articular degenerada incluem ainda, fibrilação, fissuras, ulceração e diminuição do espaço articular (Kuettner e Goldberg, 1995).

A OA é acompanhada pelo envelhecimento do condrócito, mas é diferente do envelhecimento normal da cartilagem observado com o avanço a idade. A função do condrócito e biologia da matriz extracelular são reguladas por citocinas e fatores de crescimento. A interleucina-1 é a maior citocina envolvida. A inflamação, embora presente em forma limitada em muitos casos de OA pode influenciar no curso da doença. Existem evidências que marcadores de inflamação indicam a piora do prognóstico (Hedbom e Häuselmann, 2002).

Fatores mecânicos estão envolvidos na patogênese da OA, dentre eles estão a incongruência articular, frouxidão ligamentar, instabilidade articular, fraqueza muscular e propriocepção afetada em adição a traumatismos e peso físico aumentado (Kuettner, 1998).

Alguns estudos têm mostrado diferenças moleculares entre diferentes articulações, por exemplo, joelho e tornozelo, e isto poderia resultar em diferenças na suscetibilidade a OA. Foram observadas diferenças envolvendo os componentes da matriz e o conteúdo de água. Além disso, foi identificada relativa diferença na intensidade de resposta ao estímulo do condrócito de joelhos e tornozelos. A resposta mais forte do condrócito do joelho inclui fatores que aumentam o dano a matriz cartilaginosa, tais como uma depressão de síntese da matriz e aumento da atividade enzimática. Esta resposta do condrócito do joelho resulta em dano enzimático a matriz, que as células não são capazes de reparar, enquanto que a resposta mais fraca do condrócito do tornozelo pode permitir que as células consigam reparar o dano a matriz lesada (revisado por Cole e Kuettner, 2002). A análise gênica vem sendo uma emergente ferramenta de investigação na ortopedia. Ela tem ajudado a definir, por exemplo, as diferenças entre os estágios precoces e tardios das trocas cartilaginosas na AO (Spector e McGregor, 2004).

Epidemiologia e impacto social da AO

A OA é o problema articular mais comum do mundo e é caracterizada por uma lenta e progressiva degeneração da cartilagem articular (Hedbom e Häuselmann, 2002). Esta doença foi observada em um esqueleto anterior ao período Neolítico (Rogers *et al.*, 1981) e estudos arqueológicos sugerem que a frequência relativa de OA em certas articulações e grupos étnicos tem mudado com os tempos (Inoue *et al.*, 2001).

Nos EUA, a OA é a segunda causa de dificuldade de trabalho em homens acima dos 50 anos perdendo somente para as doenças isquêmicas do coração e são responsáveis por mais hospitalizações do que a artrite reumatóide (AR) a cada ano (Dennison e Cooper, 2003). A OA afeta pessoas de todos os grupos étnicos e ocorre em todas as localizações geográficas, se desenvolve tanto em homens quanto mulheres, embora ocorra com maior frequência em mulheres (Buckwalter e Lappin, 2000). É a causa mais comum de incapacidade na maioria das populações acima dos 65 anos de idade (Felson, 1995; Praemer *et al.*, 1999).

Lawrence *et al.* (1998) estimam que mais de 20 milhões de americanos têm OA. A Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que 10% das pessoas no mundo, acima dos 60 anos sofrem de OA e 80% das pessoas com OA tem limitação dos

movimentos e 25% não podem realizar a maioria das atividades diárias (Silman e Hochberg, 1993).

A prevalência da OA em todas as articulações aumenta com a idade. Mais de um terço das pessoas acima dos 45 anos referem sintomas articulares que variam de uma rigidez articular ocasional e dor intermitente associada com atividades à perda permanente do movimento e dor profunda constante (Buckwalter e Mankin, 1997; Mannoni *et al.*, 2003). Em algumas populações mais de 75% das pessoas acima dos 65 anos tem OA que envolve uma ou mais articulações (Felson, 1995).

Apesar da alta e crescente prevalência da OA e seus profundos efeitos na função e mobilidade articular, economistas e pesquisadores de serviços de saúde têm dado pouca atenção para os custos da OA. Muitos investigadores têm agrupado a OA com outras doenças articulares ou com outras condições musculoesqueléticas, tornando impossível definir acuradamente, as conseqüências econômicas da doença (Yelin, 1998). Reginster (2002) relatou que a sobrecarga econômica total da OA é de 1 a 2,5% do produto interno bruto nacional nas nações do ocidente. Outros têm calculado que a OA custa mais de 60 bilhões de dólares por ano nos EUA (Yelin, 1998; Praemer *et al.*, 1999). Estima-se que o custo da relação da OA com o trabalho é de 3,4 a 13,2 bilhões de dólares ao ano, o que representa pelo menos o custo relacionado com as doenças renais e neurológicas juntas. Quase 51% dos custos relacionados com o trabalho, resultam de despesas médicas e 49% de perda de produtividade no trabalho e domicílio (Leigh *et al.*, 2001). Estas estimativas de impacto econômico não incluem dor e sofrimento, efeitos psicossociais adversos, perda de oportunidades por diminuição da capacidade produtiva, diminuição da capacidade em participar de exercícios físicos regulares que poderiam aumentar a saúde geral e o custo para os membros da família que ajudam a fornecer os cuidados para os pacientes com OA (Carr, 1999).

O desenvolvimento das próteses articulares representa um grande avanço na tecnologia biomédica para o tratamento definitivo da osteoartrose avançada. O implante de prótese, principalmente quadril e joelho, vem se tornando cada vez mais freqüente. Quando implantadas, propiciam redução significativa no desconforto dos pacientes acometidos por artrose da articulação coxofemural. Informações sobre custos de tratamento da coxartrose no Brasil são fragmentadas e restritas a serviços locais de saúde. Informações de caráter nacional são descritas em Macedo (2007): “Cerca de 200 mil pessoas vivem em cadeiras de rodas, devido à osteoartrose por falta de um implante ortopédico no Brasil. Os dados são da Associação Brasileira de Importadores e

Distribuidores de Implantes (Abraidi), que representa 164 empresas fabricantes, importadoras e distribuidoras de produtos de ortopedia. Segundo o Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), vinculado ao Ministério da Saúde (MS), as cirurgias ortopédicas são consideradas procedimentos de alta complexidade pelo MS, que gastou em 2003 com esse tipo de cirurgia apenas 5% do orçamento de R\$ 12 bilhões destinados a gastos com ortopedia, o equivalente a R\$ 645 milhões. Sérgio Cortês, presidente do INTO, explica que enquanto os Estados Unidos, que têm uma população de 290 milhões de habitantes, fazem 850 mil cirurgias anuais para implantes ortopédicos. O Brasil, com cerca de 180 milhões de habitantes realiza apenas 15 mil. Em 2006, somente o INTO realizou cerca de 3,5 mil cirurgias de quadril e joelho devido a osteoartrose”.

Anatomia da cartilagem articular

A articulação sinovial pode ser considerada como um órgão que exerce simultaneamente estabilidade e movimento. A espessura milimétrica da cartilagem minimiza a fricção, mas é muito fina para ter alguma função substancial na absorção de choques. Ao invés disto, a cartilagem se deforma distribuindo a carga para um maior volume de tecido, deste modo minimizando o auge do carregamento (Weightman e Kempson, 1979). Músculos e ligamentos garantem a estabilidade articular. Reflexos neuromusculares contribuem para a capacidade de absorção de choques e proteção da articulação contra injúrias.

Uma cápsula cerca a cavidade articular. A sua camada externa está em continuidade com o periósteo e a superfície interna com a membrana sinovial altamente vascularizada e enervada que serve como filtro para a difusão de componentes entre o plasma, o fluido sinovial e a cartilagem avascular. A membrana sinovial contém células especializadas que regulam a composição e o volume do fluido sinovial e em condições fisiológicas a cavidade articular está obliterada devido a uma pressão intra-articular negativa (Edwards, 1998).

A cartilagem é uma forma especializada de tecido de conexão encontrada em muitas localizações do corpo. Três tipos de cartilagem são distinguidos com base na sua quantidade relativa de matriz extracelular e na abundância de fibras colágenas e elásticas. São elas: elástica (e.g. ouvido externo e nariz), fibrosa (e.g. inserções osteotendíneas, sínfise pubiana, anel fibroso do disco intervertebral e o menisco) e

cartilagem hialina (e.g. placas de crescimento, na porção ventral das costelas, nos anéis traqueais e laríngeos e na superfície de revestimento das articulações) (Junqueira *et al.*, 1986). O viscoso núcleo pulposo dos discos intervertebrais é muitas vezes referido como um quarto tipo de cartilagem.

A cartilagem articular é altamente especializada e possui um biomaterial exclusivamente moldado que forma uma suave e aplainada superfície nas articulações diartrosicas. É uma estrutura cuja matriz é alinfática, avascular e aneural que é sintetizada por células residentes esparsamente distribuídas (Aigner e McKenna, 2002). As células da cartilagem, os condrócitos, representam uma pequena porcentagem, menos de 1% do volume da cartilagem articular no homem (Wollheim, 2003), espalhados de forma irregular dentro de uma abundante matriz extracelular composta de colágeno, proteoglicanos, água e uma quantidade muito pequena de sais de cálcio. A quantidade de condrócitos está correlacionada com a espessura da cartilagem, que por sua vez tem relação com o tamanho do corpo e o grau de incongruência articular. Os condrócitos estimulados por altas cargas são provavelmente responsáveis pela manutenção de uma maior matriz protetora (Stockwell, 1979).

Ao nível molecular, a matriz cartilaginosa consiste de dois componentes básicos: uma matriz fibrilar e outra não fibrilar. A matriz fibrilar é uma rede que consiste principalmente de colágeno tipo II, junto com outros colágenos predominantemente tipo IX e tipo XI (Bruckner e van der Rest, 1994). O colágeno tipo VI tem sido encontrado somente na matriz pericelular diretamente nos arredores do condrócito (Poole *et al.*, 1988; Hambach *et al.*, 1998). O componente não fibrilar consiste predominantemente de monômeros de agrecano altamente sulfatados ligados pelo ácido hialurônico e ligações protéicas, formando um grande agregado polianiônico (Aigner e McKenna, 2002). O agrecano consiste de um grande miolo protéico ligado covalentemente por cadeias laterais de glicosaminoglicanos, muitos dos quais são o sulfato de condroitina e sulfato de queratina. Uma ligação protéica une o agrecano ao ácido hialurônico ampliando uma longa molécula de polissacarídeo que pode unir várias centenas de moléculas de agrecano. Esta grande molécula, com um peso molecular de 100 milhões de dáltons ou mais, tem uma alta quantidade de cargas negativas, o que permite a retenção de uma grande quantidade de água. O agrecano é o proteoglicano predominante na cartilagem articular e consiste de uma proteína com aproximadamente 2000 aminoácidos.

A matriz cartilaginosa também contém um grande número de outros componentes glicoprotéicos não colágenos que são importantes para a coesão da matriz

e para a regulação da função do condrócito. Está presente a família das proteínas com repetições ricas em leucinas (RRL), a qual contém vários membros que compõem a matriz extracelular. Existem pelo menos 11 membros conhecidos desta família. Pequenos monoagregados de proteoglicanos como decorina, biglicano e fibromodulina têm sido detectados, bem como algumas proteínas da matriz cartilaginosa, incluindo a fibronectina, proteína da matriz cartilaginosa e proteína oligomérica da cartilagem, as quais estão envolvidas na expressão da regulação gênica padrão e no fenótipo condrocítico. A asporina é um membro original da família de RRL que foi parcialmente purificada da cartilagem articular humana e meniscos. Está estreitamente relacionada com a decorina e biglicano. Em contraste a estes, a asporina não é um proteoglicano e além disso, contém um trecho único de resíduos de ácido aspártico na região amino-terminal (Lorenzo *et al.*, 2001). Proteínas da camada intermediária da cartilagem (CLIP) e proteína oligomérica da matriz (COMP) são exemplos de proteínas específicas da cartilagem. A COMP é composta de 5 subunidades idênticas e une o colágeno I e II, pró-colágeno I e II e colágeno IX, desta forma esta estrutura pode explicar seu papel na montagem das fibras colágenas (Hedbom *et al.*, 1992).

A matriz cartilaginosa pode ser dividida em 4 zonas distintas: a zona superficial, média, profunda e zona de cartilagens calcificadas (Muir, 1995). Na cartilagem articular do adulto, as células da camada superficial são pequenas e planas e são orientadas de acordo com as fibras colágenas. Os condrócitos da zona média parecem maiores e mais redondos com uma aparente distribuição randomizada, assim como a estruturação das fibras colágenas. Na zona mais profunda, as células formam colunas perpendiculares em relação à superfície articular seguidas pela mesma orientação das fibras colágenas sugerindo um comportamento diferente do condrócito dependendo da sua posição nas diferentes camadas da matriz cartilaginosa (Aydelotte e Kuettner, 1988).

Quadro clínico e laboratorial da AO

O principal sintoma da OA é a dor que é localizada na articulação afetada. O envolvimento de muitas articulações pode sugerir uma forma de artrite sistêmica. Frequentemente existe pouca ou nenhuma correlação entre o sintoma articular e o grau de extensão da patologia ou troca radiológica. Somente 30% das pessoas com evidências de OA reclamam de dor no local com relevância. Algumas das aparentes disparidades entre sintomas e anormalidades radiográficas podem estar relacionadas à

definição radiográfica de OA. Por exemplo, o uso de osteófitos sozinhos como uma alteração diagnóstica tem sido questionado. O sintoma de dor frequentemente é agravado por atividades prolongadas e aliviado com o repouso e usualmente a dor pode estar acompanhada de crepitações. O principal exame para o diagnóstico de OA é o radiografia (RX, raios X), apesar de que a aparência radiológica pode ser normal nas fases iniciais da doença onde os sintomas são leves. Muitas graduações de anormalidade podem ser notadas com o progresso da doença. A diminuição do espaço articular é o resultado da degeneração e desaparecimento da cartilagem articular. Não há anormalidade laboratorial específica existente no diagnóstico da OA primária. A velocidade de sedimentação de eritrócitos (VSG), contagem sanguínea, análise de urina e determinações bioquímicas do sangue são normais em pacientes com doença primária, mas são importantes na exclusão de outras formas de artrite consideradas no diagnóstico diferencial (Moskowitz e Holderbaum, 2001).

Propriedades biomecânicas e bioquímicas da cartilagem articular

A matriz de colágeno e o componente proteoglicano hidrofílico formam um tecido resistente e flexível que segura água sob pressão e é capaz de dissipar muito da força de sustentação de peso corporal, protegendo os tecidos moles e o osso subcondral. Em termos de propriedades físicas, a força tênsil da matriz cartilaginosa vem da rede de colágeno que dificulta a expansão do componente agregado viscoelástico, fornecendo assim rigidez compressiva (Maroudas, 1976). As forças de estresse sobre a cartilagem podem ser divididas em dois tipos: estresse compressivo que cria um aumento da pressão de fluidos na matriz e o estresse de cisalhamento em 8 planos que cria uma força tênsil na matriz cartilaginosa. De uma perspectiva puramente mecânica, o tecido cartilaginoso pode tolerar força compressiva hidrostática extremamente bem por causa do fluido incompressível. Entretanto, altos níveis de cisalhamento ou sobrecarga tênsil na cartilagem causarão uma falência mecânica da matriz fibrosa (Carter *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado em condições fisiológicas, que a cartilagem quando submetida a forças de carregamento, tanto ossificação como o crescimento estão inibidos pela aplicação de força compressiva hidrostática e por outro lado, estão acelerados quando existe estresse de cisalhamento intermitente (Carter e Beaupre, 2001). O aumento da carga funcional em articulações saudáveis provocadas pelo exercício moderado causa um aumento da espessura da cartilagem articular, do

conteúdo de proteoglicanos e da resistência mecânica do tecido. Por outro lado, articulações imobilizadas em modelos animais têm causado uma ativação da frente de crescimento subcondral que conduz a invasão vascular, afinando a cartilagem e perdendo proteoglicanos (Smith *et al.*, 1992).

A formação e manutenção da matriz extracelular na cartilagem são essenciais para a função normal da articulação. Esta matriz é um microcosmo de colágeno, agrecano e outras macromoléculas não colágenas que interagem entre si para formar uma matriz resistente e elástica carregada de água. A atividade de troca do agrecano é regulada pelas metaloproteinases de matriz (MMPs), particularmente a MMP-3 (Little *et al.*, 1999). Entretanto, outras enzimas estão envolvidas como a agrecanase que contribui para a quebra proteolítica do agrecano (Arner *et al.*, 1999). A rede de colágeno tipo II é extremamente estável devido a uma tripla hélice firmemente enrolada, cuja estabilidade aumenta com a idade. Estas fibras somente podem ser quebradas pela ação das colagenases; as candidatas mais fortes para a degradação do colágeno tipo II são as MMP-1 e MMP-13. Na cartilagem normal a taxa de produção de colágeno é relativamente lenta, enquanto que a produção de proteoglicano é proporcionalmente mais rápida. A produção normal destes componentes da matriz é mediada pelos condrócitos, que são responsáveis pela síntese e degradação influenciados por inúmeros fatores, incluindo citocinas, estímulo físico e estrutural e mesmo os próprios componentes da matriz, entre muitos outros (Cawston *et al.*, 1999).

Mudanças na cartilagem osteoartrítica

Como a AO não é uma entidade única, ela certamente possui diferentes etiologias. Um número significativo de fatores de risco individuais é creditado por contribuir ao desenvolvimento da OA primária. Estes fatores de risco podem ser subdivididos em dois grupos distintos: os fatores que influenciam ou marcam uma predisposição generalizada à condição da OA e os fatores que resultam em carga biomecânica anormal em locais articulares específicos (Dennison e Cooper, 2003). Dentre os primeiros destacamos a idade, hereditariedade, obesidade, variáveis relacionadas ao sistema reprodutivo, osteoporose, hipermobilidade articular, fumo e outras doenças tais como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica e hiperuricemia, nas quais tem sido documentada a associação com OA e que são independentes da obesidade (Hochberg, 2001). Entre os fatores mecânicos destacamos o

traumatismo, o formato articular, a ocupação e os esportes e as atividades físicas de lazer. A idade sem dúvida é o fator de risco mais importante para a OA.

Os achados patológicos sugerem que a cartilagem articular é o sítio da anormalidade primária na OA. Existe uma perda da homogeneidade, disjunção e ocorre fragmentação da superfície. Manchas descontínuas de proteoglicanos são vistas na matriz e as camadas profundas de cartilagem são invadidas por capilares da cartilagem calcificada. Os condrócitos que existem como células isoladas na cartilagem normal, começam a proliferar e são encontrados em largos aglomerados repetidos, osteófitos então são formados, os quais são cobertos por cartilagem hialina irregular e fibrocartilagem. Edema da matriz devido ao conteúdo de água aumentado é visto na OA e é causado por quebra da malha de retenção do colágeno. Proliferação de condrócitos e metabolismo aumentado são outras mudanças vistas somente na OA. Esclerose do osso subcondral não é visto no envelhecimento normal. Os condrócitos, como outras células, têm uma vida limitada e uma reduzida capacidade para a divisão que diminuem com a idade (Wollheim, 2003).

Tradicionalmente a OA foi vista como uma condição degenerativa e não inflamatória, entretanto edema sinovial, sensibilidade, derrame articular e sinais clínicos de inflamação são comuns embora eventos transitórios no curso da OA. Eles poderiam ser uma resposta secundária ao dano tecidual e não um evento patogênico primário. Estudos demonstraram evidências, macroscópica e histológica de inflamação sinovial moderada, encontrados em 55% dos pacientes com OA do joelho e com radiologia normal analisados por artroscopia (Myers *et al.*, 1990). Sabe-se também que o condrócito libera mediadores muito semelhantes aos ativados pelos macrófagos onde citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1, têm sido implicadas como importantes mediadores na doença. Em resposta à interleucina-1 o condrócito incrementa a produção de óxido nítrico e prostaglandina E2, dois fatores que têm se mostrado como indutores de trocas celulares associadas com a osteoartrite (Hedbom e Häuselmann, 2002).

O mecanismo de ataque proteolítico dos principais componentes da cartilagem, agrecano e colágeno tipo II tem sido objeto de pesquisas. O agrecano tem uma capacidade média de renovação na cartilagem de uns poucos anos, comparado a várias décadas para o colágeno (Kuettner e Thonar, 1998). A redução do agrecano é um evento precoce no desenvolvimento da OA. Já existem evidências de mais de 25

metaloproteinases envolvidas no processo de degradação da cartilagem (Brinkerhoff e Matrisian, 2002).

Bases genéticas da OA

Muitos pacientes com OA têm uma história familiar da doença, e múltiplos fatores genéticos podem ser responsáveis por várias formas de OA. A OA com envolvimento das articulações dos dedos em mulheres é provavelmente a melhor forma de osteoartrite reconhecida com associação familiar, onde estudos têm demonstrado esta associação tanto clínica quanto radiológica (Hirsch *et al.*, 1994; Myers *et al.*, 1996) mas fatores hereditários também são importantes na osteoartrite do quadril (Ingvarsson *et al.*, 2000). Um estudo envolvendo 130 gêmeas homozigóticas e 120 gêmeas heterozigóticas confirmou uma forte contribuição genética para a osteoartrite em joelhos e mãos (Spector *et al.*, 1996). É razoável considerar a possibilidade de que genes que codificam as proteínas da cartilagem, como agrecano, asporina, proteína oligomérica da cartilagem (COMP), gene do colágeno II e colágenos menores (por exemplo, tipos V, IX, XI) e metaloproteinases entre outros, poderiam desempenhar um papel na predisposição genética na direção da osteoartrite primária generalizada, considerada a forma mais comum de doença idiopática com o avanço da idade.

O agrecano é o componente não colágeno mais abundante na cartilagem articular (Wight *et al.*, 1991) e um dos maiores componentes estruturais do disco intervertebral (Roughley *et al.*, 2002) e da cartilagem (Watanabe *et al.*, 1998). Possui um longo centro protéico com diferentes estruturas e regiões funcionais (Doerge *et al.*, 1991). No domínio N-terminal do centro protéico existem duas regiões globulares (G1 e G2) separadas por um curto domínio interglobular. Estas regiões são seguidas por uma longa região estendida, a região de ligações a glicosaminoglicanos (GAG) nas quais numerosas cadeias de sulfato de queratina (SQ) e sulfato de condroitina (SC) são ligadas (Figura 1). A região de ligações de sulfatos do glicosaminoglicano é dividida em três domínios adjacentes, responsáveis pela ligação do SQ ou SC. O gene humano do agrecano está localizado no cromossomo 15q26 (Korenberg *et al.*, 1993). Uma importante função do agrecano é a manutenção do conteúdo de água necessária às funções da cartilagem. A molécula pode servir em outras funções que envolvem interações com outras moléculas da matriz e fatores de crescimento de baixo peso molecular. Um polimorfismo foi identificado no éxon 12 no domínio CS1. Foram descritos pelo menos 13 alelos neste

polimorfismo (Doege *et al.*, 1997). Os alelos mais comuns possuem 26, 27 ou 28 repetições (Figura 2). Alguns trabalhos tentam demonstrar a associação deste polimorfismo com a osteoartrite na população (Horton *et al.*, 1998; Kirk *et al.*, 2003; Roughley *et al.*, 2006; Kämäräinen *et al.*, 2006).

Além do agrecano, outros genes têm sido relacionados com a OA, incluindo proteínas da matriz extracelular (ECM), tais como colágeno, proteoglicanos, tenacina, proteína oligomérica da matriz (COMP); proteínas de crescimento que regulam o ciclo celular, tais como ciclinas e proteínas quinase dependentes de ciclinas (CDKs); citocinas, como, por exemplo, interleucinas IL-1, 4, 6; fatores de crescimento, tais como fator de crescimento transformador β (TGF- β) e fatores de crescimento ósseo (BMP); fatores angiogênicos e antiangiogênicos, tais como fator de crescimento venoso endotelial (VEGF), fatores de crescimento de tecido de conexão (CTGF), angiopoetina 2 e endostatina; e metaloproteinases de matriz (MMPs) (Henderson e Carter, 2002; Wong e Carter, 2003).

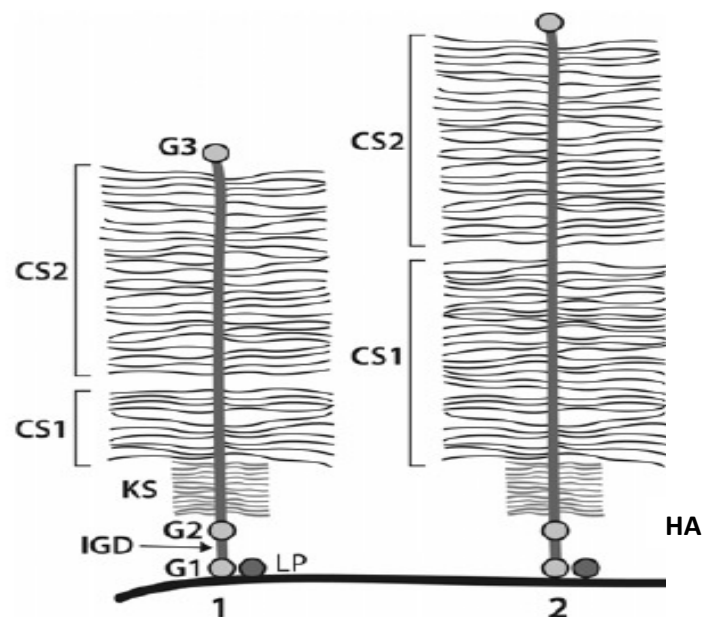


Figura 1. Variação no número de repetições em tandem no domínio CS1 resulta em diferentes tamanhos da molécula de agrecano. Os números 1 e 2 mostram duas moléculas de agrecano codificados por diferentes alelos do gene agrecano. G1-G3 representam os domínios globulares da proteína, CS-1 e CS-2 representam os domínios de ligação ao sulfato de condroitina, KS representa o domínio de ligação ao sulfato de queratano, IGD representa o domínio interglobular, HA representa uma molécula de ácido hialurônico e LP representa a proteína de ligação (Modificado de Roughley *et al.*, 2006).

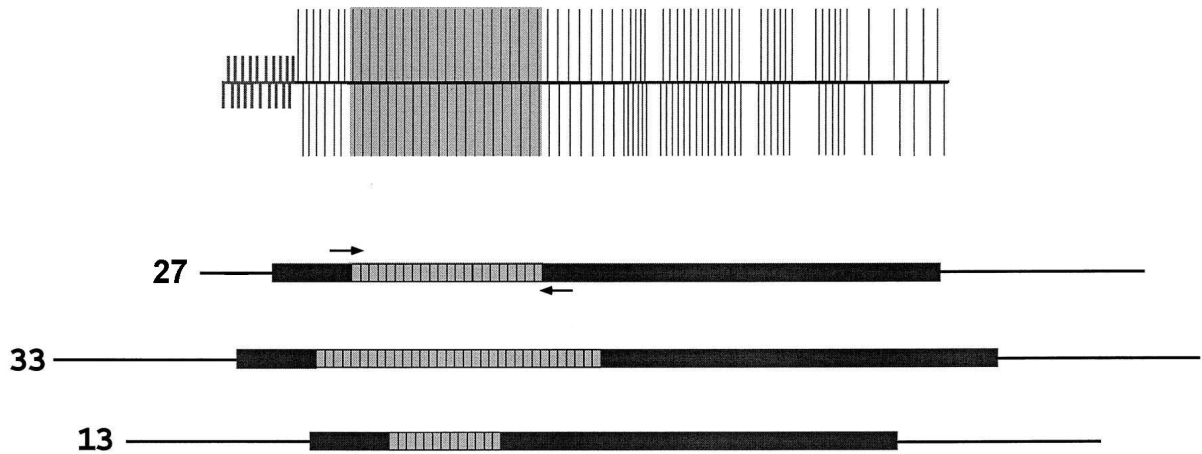


Figura 2. Diagrama do polimorfismo de número variável de repetições in tandem (VNTR) do gene *aggrecano* e sua implicação na estrutura da molécula de *aggrecano*. A parte superior da figura mostra um modelo do *aggrecano* humano. A linha horizontal representa a proteína e as linhas verticais representam as cadeias de glicosaminoglicanos ligadas à proteína, com as linhas longas representando o número e posição das cadeias de sulfato de condroitina, e as linhas curtas representando as cadeias de sulfato de queratano. A porção destacada em cinza representa a parte da proteína na qual está localizado o polimorfismo VNTR. Diferenças nesta região são mostradas para os alelos 27 (o mais freqüente em diversas populações), 33 (o maior alelo descrito) e 13 (o menor alelo descrito) (modificado de DOEGE *et al.*, 1997).

Justificativa e objetivos

Considerando a contribuição dos fatores genéticos para o desenvolvimento da doença degenerativa idiopática da cartilagem articular (osteoartrite) em especial a coxartose e o número de indivíduos afetados por esta doença causando grande impacto social e econômico em nosso meio, o presente estudo tem como objetivo investigar a associação entre o polimorfismo do éxon 12 do gene do agrecano e o risco ao desenvolvimento da doença degenerativa idiopática da cartilagem do quadril.

Artigo

Associação entre o polimorfismo VNTR do gene do agrecano e a osteoartrose coxofemural

Introdução

A osteoartrose OA é a mais comum das doenças das articulações e estudos epidemiológicos sugerem que os fatores genéticos estão envolvidos na OA (Spector *et al.*, 1996). Acredita-se que um desequilíbrio entre a síntese e degradação de moléculas da matriz extracelular resulte na destruição da cartilagem, levando o indivíduo a dor, fraqueza e alterações estruturais na articulação envolvida, tendo como maior determinante a idade (Moskowitz *et al.*, 2004). Dentre as articulações envolvidas, a osteoartrose do quadril é uma importante causa de dor e incapacidade especialmente em idosos.

A matriz extracelular contém pelo menos 40 proteínas não colágenas entre as quais o agrecano, um grande proteoglicano agregando o sulfato de condroitina e sulfato de queratana, cuja importância está na sua alta abundância na cartilagem e o seu envolvimento na capacidade de reduzir o estresse mecânico articular.

A sequência codificadora completa do gene do agrecano foi descrita por Doege *et al.* (1991) e sua localização (15q26) foi descrita por Korenberg *et al.* (1993). Doege *et al.* (1997) descreveram um polimorfismo no éxon 12 do gene do agrecano com um número variável de repetições em tandem (VNTR). Catorze alelos foram descritos, variando entre 13 e 33 repetições (Doege *et al.*, 1997).

Estudos mostram alterações significativas na síntese dos glicosaminoglicanos (GAG) durante a degeneração da cartilagem, bem como, no número e tamanho das cadeias para a ligação do sulfato de condroitina que parecem estar associados com o desenvolvimento da OA (Hardingham e Bayllis, 1990).

O presente estudo tem como objetivo investigar a associação do polimorfismo do éxon 12 do gene do agrecano e a coxartrose em indivíduos do sul do Brasil.

Materiais e Métodos

Indivíduos estudados

O presente estudo foi previamente aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição, da qual faz parte o Hospital Cristo Redentor, e da Universidade Luterana do Brasil. Foram incluídos no estudo 102 indivíduos adultos não relacionados portadores de coxartrose idiopática classificados como tipo III e IV da classificação de Kellgreen e Lawrence (Kellgreen e Lawrence, 1957). Após os pacientes assinarem um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), responderam a um questionário padronizado (Anexo 2), com dados como: idade, peso e altura, profissão, início dos sintomas, lado afetado, tabagismo e histórico familiar, além de uma história clínica. Os exames radiográficos foram avaliados conforme a classificação de Kellgreen e Lawrence em incidências em anteroposterior de bacia incluindo o fêmur proximal e perfil da coxofemural queixosa. Os indivíduos que por ventura realizaram tratamentos definitivos de protetização previamente, também foram aceitos com a obtenção das radiografias iniciais, nas mesmas condições descritas, arquivadas ou guardadas como forma de comprovação da osteoartrite na sua forma idiopática. Foram também realizados exames de VSG e proteína C reativa como forma de exclusão de osteoartrite de origem inflamatória.

No grupo controle foram incluídos 94 indivíduos saudáveis doadores do banco de sangue e 57 indivíduos assintomáticos para coxartrose com idade igual ou superior a 60 anos e exame radiográfico sem evidências de coxartrose e que em dado momento procuram o serviço por outros motivos de dor musculoesquelética, totalizando 151 indivíduos controle.

Análises genéticas

DNA de alto peso molecular foi extraído a partir de sangue total pelo método descrito por Lahiri e Nurnberger (1991). O polimorfismo VNTR do gene do agrecano foi genotipado através da amplificação das amostras pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A sequência dos primers utilizados foi 5'-ATTGAGTGGCCCAGCACTCCTACG-3' e 5' - AGGTCCCCTACCGCAGAGGTAGAA - 3'. A reação de amplificação foi realizada em 25 µl contendo DNA genômico, 1 mM de cada primer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM

dNTPs, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH=8,3) e 1 U de *Taq* DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em 35 ciclos, cada ciclo consistindo de desnaturação a 94°C por 15 segundos, e anelamento e extensão a 72°C por 2,5 minutos. Os fragmentos amplificados podem variar de 742 pares de bases, para o alelo de 13 repetições, até 1882 pares de bases, para o alelo de 33 repetições. Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. O tamanho dos fragmentos foi analisado e estimado por comparação com a migração das bandas de DNA dos marcadores de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega) e Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados com nitrato de prata (Sanguinetti *et al.*, 1994). As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular Humana do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil.

Análises estatísticas

As frequências alélicas foram determinadas através da contagem direta dos alelos. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados através do teste de χ^2 . A comparação das frequências alélicas com outras populações também foi realizada através do teste de χ^2 . Variáveis quantitativas foram comparadas usando o teste t de Student ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney, conforme indicação. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Na Tabela 1 são apresentados os dados clínicos e demográficos dos pacientes e controles. Os pacientes estudados compreenderam 45 homens e 57 mulheres que procuram o ambulatório de quadril do Hospital Cristo Redentor com queixas de dor e ou desconforto no quadril. A média de idade foi de 61,8 anos (desvio padrão, $\pm 9,1$ anos). Dos 151 indivíduos controle estudados, 62 foram homens e 89 mulheres, com média de idade de 57,8 anos (desvio padrão, $\pm 8,2$ anos), não apresentando diferenças significativas quanto à proporção sexual e à idade com relação aos pacientes.

No grupo dos pacientes a idade para o início dos sintomas foi de $56,1 \pm 9,1$ anos (média \pm desvio padrão). A menor idade para o início dos sintomas foi 32 e a maior foi 81 anos. A média de tempo decorrido para o início dos sintomas foi de $5,7 \pm 1,8$ anos.

Estes pacientes não apresentavam má formação aparente do quadril, nenhuma história de infecção, poliartralgias, trauma ou cirurgia prévia que pudesse ter induzido a coxartrose. Dos 102 pacientes, 23 (22,5%) já haviam realizado artroplastia total de quadril e se enquadravam nos critérios para a inclusão deste estudo (Tabela 1).

Nos pacientes, a média do índice de massa corpórea (IMC) dos pacientes foi de $25,8 \pm 3,3$ sendo 18,8 o menor e 35,2 o maior IMC. A incidência de tabagismo foi de 11,8% e havia história familiar em 15,7% dos pacientes. Nos controles, a média do índice de massa corporal (IMC) foi de $24,1 \pm 2,7$, sendo o menor 19,8 e o maior 31,2 (Tabela 1).

O lado direito foi acometido em 28 pacientes (27,5%), o lado esquerdo em 34 pacientes (33,3%) e em 40 a doença tinha acometimento bilateral (39,2%). Em relação à atividade profissional a maioria dos indivíduos não tinha histórico de trabalho braçal pesado (69,6%) (Tabela 1).

Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos pacientes OA e controles.

	Pacientes (n=102)	Controles (n=151)
Sexo masculino	45 (44,1)	62 (41,0)
Idade (anos)	$61,8 \pm 9,1$	$57,8 \pm 8,2$
Índice de massa corpórea (Kg/m ²)	$25,8 \pm 3,3$	$24,1 \pm 2,7$
Idade de início dos sintomas (anos)	$56,1 \pm 9,1$	-
Tempo de início dos sintomas (anos)	$5,7 \pm 1,8$	-
Tabagismo	12 (11,8)	-
Uso de prótese	23 (22,5)	-
Histórico familiar	16 (15,7)	-
Acometimento direito	28 (27,5)	-
Acometimento esquerdo	34 (33,3)	-
Acometimento bilateral	40 (39,2)	-

As frequências alélicas dos pacientes e controles são mostradas na Tabela 2. Na amostra total, 17 alelos e 35 genótipos foram observados, sendo mais frequentes os alelos 26, 27 e 28 em ambos os grupos. No grupo controle, 15 alelos e 30 genótipos foram observados, com 27,8% dos indivíduos sendo homozigóticos. No grupo de pacientes, 15 alelos e 29 genótipos foram observados, com 22,1% dos indivíduos sendo

homozigóticos. A frequência de alelos com menos de 23 repetições nos pacientes foi de 10,3% enquanto que no grupo controle foi de 4,6% ($p=0,014$; OR = 2,36; CI 95% 1,11-5,15).

Tabela 2. Frequências alélicas do polimorfismo do éxon 12 do gene do agrecano em pacientes OA e controles.

Alelo	Pacientes (n=102)		Controles (n=151)	
	n	%	n	%
13	0	0	2	0,7
14	1	0,5	0	0
18	2	1,0	1	0,3
19	2	1,0	2	0,7
20	2	1,0	2	0,7
21	5	2,4	2	0,7
22	9	4,4	5	1,6
23	6	2,9	8	2,6
24	2	1,0	1	0,3
25	6	2,9	6	2,0
26	24	11,8	35	11,6
27	74	36,3	128	42,4
28	62	30,4	103	34,1
29	7	3,4	4	1,3
30	0	0	2	0,7
31	1	0,5	1	0,3
33	1	0,5	0	0

Não foi observada uma diferença significativa nos escores alélicos, definido como o somatório do número de repetições CS1 presentes nos dois alelos do agrecano de cada indivíduo, entre os pacientes e o grupo controle (Figura 3). Também não foram observadas diferenças significativas nas frequências alélicas entre pacientes com e sem prótese.

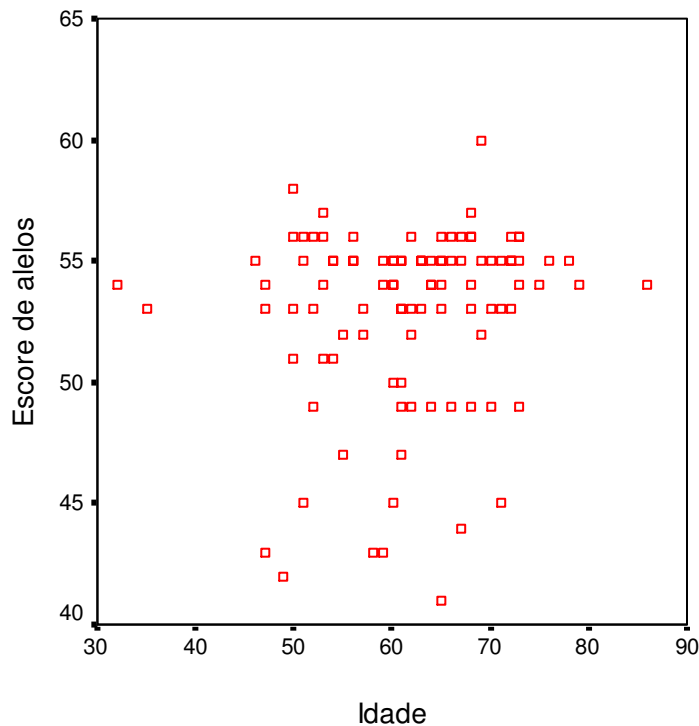


Figura 3. Distribuição da idade e do escore dos alelos (somatório do número de repetições CS1 presentes nos dois alelos do agrecano de cada indivíduo) na amostra de pacientes estudados.

Discussão

No processo de degeneração da cartilagem articular, ocorre uma diminuição do conteúdo de água e degradação dos proteoglicanos. Com a ação das metaloproteinases, ocorre degradação das cadeias CS2 do agrecano (Pratta *et al.*, 2000) resultando apenas as cadeias CS1, tornando mais pronunciadas as diferenças de tamanhos nos alelos. Alelos menores, com menor número de cadeias CS1 teriam menor capacidade de ligações ao sulfato de condroitina e, conseqüentemente, poderiam levar a uma redução na capacidade do agrecano de desempenhar suas funções estruturais, como por exemplo, resistir a cargas de tensão e compressão, originando assim um aumento de suscetibilidade à degradação tecidual (Urban *et al.*, 2000; Rougley *et al.*, 2006). Necessidades articulares usuais poderiam resultar em dano tecidual nos indivíduos portadores de alelos menores através de mecanismo de menor hidratação do agrecano, ou desencadeando respostas celulares adversas como secreção aumentada de proteases (Adams e Dolan, 2005).

O presente estudo revelou que indivíduos portadores de coxartrose apresentam uma maior frequência de alelos menores de 23 repetições do polimorfismo VNTR do gene do agrecano do que os indivíduos do grupo controle. Estudos anteriores analisaram a associação deste polimorfismo com a osteoartrite em diferentes populações e encontraram resultados controversos. O primeiro estudo de associação entre o polimorfismo CS1 do agrecano humano e a degeneração da cartilagem articular foi em relação à OA bilateral das mãos (Horton *et al.*, 1998). O grupo de estudo consistiu de 93 homens caucasóides com idades acima de 60 anos (média 72 anos) com OA de mãos e/ou joelhos. A presença do alelo 27 foi associada com artrose bilateral das mãos, entretanto não houve associação estatisticamente significativa entre o alelo 27 e a OA do joelho bilateral. Nenhum outro alelo mostrou qualquer associação com a AO. Um segundo estudo consistiu da análise de 134 gêmeos australianos com idades acima de 50 anos (34 pares de gêmeos homozigóticos e 27 pares de gêmeos heterozigóticos) que tinham OA das mãos, quadris e/ou joelhos (Kirk *et al.*, 2003). As análises estatísticas foram realizadas somente nos alelos com 25, 26, 27 e 28 repetições, por terem sido suficientemente representados na amostra, totalizando 95,4% dos indivíduos. Foi reportado que os alelos com 25 e 28 repetições foram associados com uma baixa prevalência de OA de joelho e quadril, respectivamente. Os resultados foram interpretados como sendo consistentes com um efeito protetor dos alelos com 25 e 28 repetições em algumas formas de AO. Estes resultados representam uma contradição com aqueles do estudo de Horton *et al.* (1998), no qual um efeito deletério foi relacionado com o alelo 27. Recentemente, Roughley *et al.* (2006) estudaram 165 indivíduos de ambos os sexos com idades de 18 a 77 anos divididos em três grupos: 63 com OA primária do quadril, 44 com doença degenerativa do disco intervertebral e 58 indivíduos controle sem histórico de qualquer patologia. A análise do polimorfismo VNTR mostrou 13 alelos de diferentes tamanhos, com o alelo de 27 repetições sendo o mais abundante. Não foi observada correlação entre o polimorfismo do agrecano e doença degenerativa do disco intervertebral ou osteoartrite primária do quadril. Assim como no estudo de Roughley *et al.* (2006) a nossa série contou com indivíduos candidatos a artroplastia total de quadril e não tinham evidências de artrite inflamatória, congênita, traumática ou vascular associada. O alelo 27 também foi o mais frequente, entretanto seus resultados foram diferentes em relação aos nossos dados, dando sinais de que muitos outros fatores podem influenciar a predisposição a doença degenerativa da articulação coxofemural além do polimorfismo do gene do agrecano. Os autores

comentaram as limitações do estudo, tais como, tamanho relativamente pequeno da amostra e larga faixa etária dos participantes (18 a 77 anos). Kämäräinen *et al.* (2006) estudaram 530 mulheres finlandesas divididas em dois grupos de ocupações academicamente similares e com exposição de carga nas mãos completamente diversas (288 dentistas e 242 professoras) demonstrando que as mulheres com a presença do alelo com 27 repetições tinham um risco menor de desenvolver OA das mãos. O estudo também indicou que a presença de alelos mais curtos ou mais longos poderia predispor ao desenvolvimento da doença.

A matriz extracelular da cartilagem articular apresenta uma composição semelhante a do disco intervertebral, o agrecano é um de seus principais componentes e a capacidade de resistir às forças compressivas depende de grandes agregados de proteoglicanos. Assim como na cartilagem articular, uma alteração no agrecano poderia resultar em prejuízo na função do disco intervertebral. Kawaguchi *et al.* (1999), ao analisarem o polimorfismo VNTR do agrecano, compararam mulheres japonesas jovens com e sem degeneração discal. Apesar de ser uma amostra pequena de 64 indivíduos (32 pacientes e 32 controles), foi observada uma diferença significativa na distribuição dos alelos entre pacientes e controles, com uma maior representação dos alelos menores em indivíduos com degeneração discal em vários níveis.

As articulações humanas apresentam uma grande variação na suscetibilidade a doenças articulares (Cole e Kuettner, 2002). Esta variação pode ser resultado das diferenças já bem definidas existentes entre os componentes da matriz e conteúdo de água entre diferentes articulações, bem como de diferenças nas respostas dos condrócitos a estímulos. Os condrócitos são responsáveis pela manutenção do matriz, através da síntese de colágenos e proteoglicanos, bem como de enzimas envolvidas com sua degradação, principalmente metaloproteinases de matriz. As articulações com diferenças na suscetibilidade à artrose podem ser divididas entre aquelas nas quais os processos de reparo são dominantes e aquelas nas quais a degradação é relativamente mais ativa (Poole *et al.*, 1994). Além disso, os fatores de risco variam entre diferentes articulações; nos joelhos, por exemplo, os fatores de risco incluem não somente a idade, mas também o sexo, anormalidades biomecânicas, trauma, obesidade e talvez o exercício (Cole e Kuettner 2002). Desta forma, é possível que alelos do polimorfismo do agrecano não determinem se o indivíduo irá desenvolver osteoartrose, mas talvez se relacione com a possibilidade dele desenvolver alteração tecidual mais cedo do que poderia ocorrer sem a presença destes alelos. Além disso, como um alelo é herdado da

mãe e outro do pai, é possível que alelos menores sejam compensados pela presença de alelos maiores e que o processo degenerativo só tenha relação com o polimorfismo em condições específicas.

A associação observada por Horton *et al.* (1998) e Kämäräinen *et al.* (2006) entre o alelo 27 e a osteoartrose é difícil de explicar com base no conhecimento atual das funções do agrecano. Se estas correlações estão corretas, a associação do polimorfismo do agrecano com a degeneração da cartilagem é independente dos alelos menores de CS1, e devido a outras características da estrutura do domínio CS1, tais como diferenças na glicosilação ou na suscetibilidade à proteólise. Enquanto não forem observadas evidências de tais diferenças, elas não podem ser categoricamente excluídas.

Observando-se os estudos realizados até o momento verifica-se que o polimorfismo VNTR do gene do agrecano foi estudado em grupos de pacientes com patologias distintas de OA, principalmente de mãos, com tamanhos amostrais geralmente pequenos e resultados conflitantes. Baseado nestes estudos permanece incerto se existe ou não uma associação direta entre o comprimento CS1 do agrecano e a osteoartrite. Devido à importância clínica do AO e do importante papel desempenhado pelo agrecano na cartilagem, este polimorfismo continuará sendo objeto de estudo no campo da ortopedia.

Conclusão e perspectivas

Evidências para a predisposição genética da coxartrose têm sido analisadas e o agrecano, por ser o maior glicosaminoglicano da cartilagem, tem sido incluído nestes estudos. O presente estudo encontrou que a frequência de alelos com menos de 23 repetições nos pacientes foi de 10,3% enquanto que no grupo controle foi de 4,6% revelando uma associação estatisticamente significativa entre a coxartrose e alelos menores do que 23 repetições do polimorfismo VNTR do éxon 12 do gene do agrecano. Esta observação indica que estes alelos podem ser um fator de risco para a coxartrose na população estudada.

As perspectivas de continuidade do presente estudo estão relacionadas à análise do polimorfismo do gene agrecano em diferentes grupos étnicos e envolvendo maior número de indivíduos, para tentar estabelecer de forma mais clara qual a associação entre o polimorfismo do agrecano e a coxartrose. Estudos em outros genes candidatos, tais como a asporina, também devem ser realizados visando definir as bases genéticas da coxartrose. Além disso, uma caracterização clínica e radiológica mais completa dos pacientes permitirá a avaliação conjunta de fatores importantes na caracterização da doença. Dois tipos de osteoartrose do quadril são encontrados: a coxartrose primária ou idiopática, na qual a causa fundamental não pode ser determinada, e a coxartrose secundária, na qual o fator predisponente é bem definido. O nosso estudo incluiu somente indivíduos com coxartrose idiopática, entretanto, a este tipo de coxartrose pode eventualmente ser confundido com displasias, um tipo de artrose do quadril secundária (Resnick e Niwayama, 1988). Estudos de coorte associados a estudos genéticos poderiam auxiliar na melhor compreensão da história natural da coxartrose, permitindo maior controle sobre eventuais fatores de confusão como o referido acima.

Referências bibliográficas

- Adams MA, Dolan P. Spine biomechanics. *J Biomech.* 38: 1972-83, 2005.
- Aigner T, Mckenna L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci.* 59:5-18, 2002.
- Arner EC, Pratta MA, Trzaskos JM, Decicco CP, Tortorella MD. Generation and characterization of aggrecanase. A soluble, cartilage-derived aggrecan-degrading activity. *J Biol Chem.* 274:6594-6601, 1999.
- Aydelotte MB, Kuettner KE. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Conect Tissue Res.* 18:205-222, 1988.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:207-214, 2002.
- Bruckner P, van der Rest M. Structure and function of cartilage collagens. *Microsc Res Technol.* 28:378-384, 1994.
- Buckwalter JA, Lappin DR. The disproportionate impact of chronic arthralgia and arthritis among women. *Clin Orthop* 372:159-168, 2000.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage II. Degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg* 79A:612-632, 1997.
- Carr AJ. Beyond disability: Measuring the social and personal consequences of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7:230-238, 1999.
- Carter DR, Beaupre GS. Skeletal function and form: Mechanobiology of skeletal development, aging and regeneration. Ed Cambridge. England: Cambridge University Press, 2001.
- Carter DR, Beaupré GS, Wong M, Smith RL, Andriacchi TP, Schurman DJ. The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration. *Clin Orthop Relat Res.*427:69-77, 2004.
- Cawston T, Billington C, Cleaver C, Elliott S, Hui W, Koshy P, Shingleton B, Rowan A. The regulation of MMPs and TIMPs in cartilage turnover. *Ann N Y Acad Sci.* 878:120-129, 1999.
- Cole AA, Kuettner KE. Molecular basis for differences between human joints. *Cell Mol Life Sci.* 59:19-26, 2002.
- Dennison E, Cooper C. Osteoarthritis: epidemiology and classification. In: Hochberg

- MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, Rheumatology. 3 ed. Spain: Mosby, p1781-91, 2003.
- Doege KJ, Coulter SN, Meek LM, Maslen K, Wood JG. A human-specific polymorphism in the coding region of the aggrecan gene: variable number tandem repeats produce a range of core protein sizes in the general population. *J Biol Chem.* 272:13974-9, 1997.
- Doege KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem.* 266:894-902, 1991.
- Edwards JCV. Synovial physiology in the context of osteoarthritis. In: Brandt KC, Doherty M, Lohmander LS. *Osteoarthritis*, p167-75, 1998.
- Felson DT. The Epidemiology of osteoarthritis: Prevalence and risk factors. In: Kuettner KE, Goldberg VM (eds). *Osteoarthritic Disorders*. Rosemont, IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons, p13-24, 1995.
- Hambach L, Neureiter D, Zeiler G, Kirchner T, Aigner T. Severe disturbance of the distribution and expression of type VI collagen chains in osteoarthritic articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 41:986-96, 1998.
- Hardingham T, Bayliss M. Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. *Semin Arthritis Rheum* 20:12-33, 1990.
- Hedbom E, Häuselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 59:45-53, 2002.
- Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, Sommarin Y, Wendel M, Oldberg A, Heinegård D. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem.* 267:6132-6, 1992.
- Henderson JH, Carter DR. Mechanical induction in limb morphogenesis: The role of growth-generated strains and pressures. *Bone* 31:645-3, 2002.
- Hirsch RM, Lethbridge-Cejku M, Scott WW, Jr, Reichle R, Plato CC, Tobin JD, Hochberg MC. A study of familial aggregation in a healthy, community-dwelling population. *Arthritis Rheum.* 37: S370, 1994.
- Hochberg MC. Osteoarthritis. In: Silman AS, Hochberg MC, eds. *Epidemiology of rheumatic diseases*. Oxford: Oxford University Press, 2001.
- Horton Jr WE, Lethbridge-Cejku M, Hochberg MC, Balakir R, Precht P, Platos CC,

- Tobin JD, Meek L, Dodge K. An aggrecano polymorphism allele and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 6, 245-251, 1998.
- Ingvarsson T, Stefánsson SE, Hallgrímsdóttir IB, Frigge ML, Jónsson H, Gulcher J, Jónsson H, Ragnarsson JI, Lohmander LS, Stefánsson K. The inheritance of hip osteoarthritis in Iceland. *Arthritis Rheum.* 43:2785-92, 2000.
- Inoue K, Hukuda S, Fardellon P, Yang ZQ, Nakai M, Katayama K, Ushiyama T, Saruhashi Y, Huang J, Mayeda A, Catteddu I, Obry C. Prevalence of large-joint osteoarthritis in Asian e Caucasian skeletal populations. *Rheumatology* 40: 70-73, 2001.
- Junqueira LC, Carneiro J, Long JA. *Cartilage. Basic Histology.* Los Altos: Lange Medical Publications, p130-9, 1986.
- Kämäräinen OP, Solovieva S, Vehmas T, Luoma K, Leino-Arjas P, Riihimäki H, Ala-Kokko L, Männikkö M. Aggrecano core protein of a certain length is protective against hand osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 14:107-1080, 2006.
- Kawaguchi Y, Osada R, Kanamori M, Ishihara H, Ohmori K, Matsui H, Kimura T. Association between an aggrecan gene polymorphism and lumbar disc degeneration. *Spine.* 24:2456-60, 1999.
- Kellgren JH, Lawrence JS. Radiologic assessment of osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis;* 16:494-501, 1957.
- Kirk KM, Doege KJ, Hecht JT, Bellamy N, Martin NG. Osteoarthritis of the hand, hips and knee in an Australian twin sample. Evidence of association with the aggrecano VNTR polymorphism. *Twin Res* 6:62-66, 2003.
- Korenberg JR, Chen XN, Doege K, Grover J, Roughley PJ. Assignment of the human aggrecano gene (AGC1) to 15q26 using fluorescence in situ hybridization analysis. *Genomics* 16:546-548, 1993.
- Kuettner K, Goldberg VM eds. *Osteoarthritic disorders.* Rosemont, Il: American Academy of Orthopedic Surgeons, p xxi-xxv, 1995.
- Kuettner KE, Thonar EJ-MA. Cartilage integrity and homeostasis. In: Klippel JH, Dieppe PA. *Rheumatology*, 2nd ed. London: Mosby, 8.6.1-8.6.15, 1998.
- Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444, 1991.
- Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Liang MH, Pillemer SR, Steen VD, Wolfe F.

- Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 41:778-779, 1998.
- Leigh JP, Seavey W, Leistikow B. Estimating the costs of job related arthritis. *J Rheumatol* 28:1647-1654, 2001.
- Little CB, Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Mort JS, Roughley PJ, Dent C, Caterson B. Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. *Biochem. J.* 344:61-68, 1999.
- Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, Bayliss MT, Neame PJ, Heinegar D. Identification and characterization of asporin. A novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *J Biol Chem* 276:12201-12211, 2001.
- Macedo CAS. Desenvolvimento de haste femoral não cimentada nacional, validada por normas internacionais. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.
- Mannoni A, Briganti MP, Di Bari M, Ferrucci L, Costanzo S, Serni U, Masotti G, Marchionni N.. Epidemiological profile of symptomatic osteoarthritis in older adults: A population based study in Dicomano, Italy. *Ann Rheum Dis* 62:576-578, 2003.
- Maroudas A. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerative cartilage. *Nature* 260:808-809, 1976.
- Moskowitz RW, Holderbaum D. Clinical and laboratory findings in osteoarthritis. In:Koopman WJ (Ed), *Arthritis and Allied Conditions*. 15 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p2216, 2001.
- Moskowitz RW, Kelly MA, Lewallen DG.. Understanding osteoarthritis of the knee – causes and effects. *Am J Orthopaedic* 33:5-9, 2004.
- Muir II. The chondrocyte, architect of cartilage. *BioEssays* 17: 1039-1048, 1995.
- Myers RH, Couropmitree NN, Chaisson CE, Hannan MT, Zhang Y, McAlindon T, LaValley M, Felson DT. Relative heritability of osteoarthritis (OA) in different hand knee joint groups: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 39:S170, 1996.
- Myers SL, Brandt KD, Ehlich JW, Braunstein EM, Shelbourne KD, Heck DA, Kalasinski LA. Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 17:1662 – 1669, 1990.
- Poole CA, Ayad S., Schofield JR. Chondrons from articular cartilage: I.

- Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *J Cell Sci.* 90: 635-643, 1988.
- Poole AR, Ionescu M, Swan A, Dieppe PA. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. *J Clin Invest.* 94:25-33, 1994.
- Praemer AP, Furner S, Rice DP. Musculoskeletal conditions in the United States. Rosemont, Illinois, American Academy of Orthopaedic Surgeons, p182, 1999.
- Pratta MA, Tortorella MD, Arner EC. Age-related changes in aggrecan glycosylation affect cleavage by aggrecanase. *J Biol Chem.* 275:39096-102, 2000.
- Reginster JY. The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 41:3-6, 2002.
- Resnick D, Niwayama S. Degenerative joint disease in specific locations. *Diagnosis of Bone and Joint Disorders.* Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 1426-1442, 1988.
- Rogers J, Dieppe P, Watt I. Arthritis in Saxon and medieval skeletons. *Br Med J* 283:668-671, 1981.
- Roughley P, Martens D, Rantakokko J, Alini M, Mwale F, Antoniou J. The involvement of aggrecan polymorphism in degeneration of human intervertebral disc and articular cartilage. *Eur Cells Materials* 11:1-7, 2006.
- Roughley PJ, Alini M, Antoniou J. The role of proteoglycans in aging, degeneration and repair of the intervertebral disc. *Biochem Soc Trans* 30:869-874, 2002.
- Roughley PJ. Articular cartilage and changes in arthritis: noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res* 3:342-7, 2001.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:914-921, 1994.
- Silman AJ, Hochberg, MC *Epidemiology of the rheumatic diseases.* Oxford, Oxford University Press, 1993.
- Simon LS. Osteoarthritis: A review. *Clin Cornerstone* 2:26-37, 1999.
- Smith RL, Thomas KD, Schurman DJ, Carter DR, Wong M, van der Meulen MC. Rabbit knee immobilization: bone remodeling precedes cartilage degradation. *J Orthop Res.* 1:88-95, 1992.
- Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* 312: 940-3, 1996.
- Spector TD, McGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 12:S39-44, 2004.

- Stockwell RA. The pericellular environment. *Biology of cartilage cells*. Cambridge: Cambridge University Press, p32-80, 1979.
- Urban JPG, Roberts S, Ralphs JR. The nucleus of the intervertebral disc, from development to degeneration. *Amer Zool* 40:53-61, 2000.
- Watanabe H, Yamada Y, Kimata K. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J Biochem (Tokyo)* 124:687-693, 1998.
- Weightman B, Kempson GE. Load carriage. In *adult articular cartilage*. Freeman MAR, Tunbridge Wells: Pitman Medical, pp291-329, 1979.
- Wight TN, Heinegard DK, Hascall VC. Proteoglycans in cell biology of the extracellular matrix. Hay ED, ed. New York: Plenum Press, p45-78, 1991.
- Wollheim FA. Pathogenesis of osteoarthritis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. *Rheumatology*. 3 ed. Spain: Mosby, p1801-15, 2003.
- Wong M, Carter DR. Articular cartilage functional Histomorphology and mechanobiology: A research perspective. *Bone* 33:1-13, 2003.
- Yelin E. The economics of osteoarthritis. In Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS (eds). *Osteoarthritis*. Oxford, Oxford University Press, p23-30, 1998.

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA														
Título do Projeto: Bases genéticas da degeneração da cartilagem articular														
Área do Conhecimento: Genética					Número de participantes: 300		No centro: 300							
Curso: PPG Diagnóstico Genético e Molecular					Unidade: Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão									
Projeto Multicêntrico		<input type="checkbox"/>	Sim	<input checked="" type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Nacional	<input type="checkbox"/>	Internacional	Cooperação Estrangeira	<input type="checkbox"/>	Sim	<input checked="" type="checkbox"/>	Não
Patrocinador da pesquisa: ULBRA – Projeto de pesquisa														
Instituição onde será realizado: ULBRA														
Nome dos pesquisadores e colaboradores: Daniel Simon e Paulo Cezar Schütz														

Você está sendo convidado(a) para participar do projeto de pesquisa acima identificado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir, a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo para você.

2. IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA									
Nome:						Sexo:			
Data de Nasc.:				Nacionalidade:					
Profissão:				Estado Civil:					
RG:		CPF/MF:			E-mail:				
Telefone resid.: ()						Telefone cel.: ()			
Endereço:									
CEP:					Cidade:				

3. IDENTIFICAÇÃO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL									
Nome: Daniel Simon						Telefone: 3477 4000 R. 2668			
Profissão: Professor universitário						E-mail: daniel.simon@ulbra.br			
Endereço: Av. Farroupilha, 8001 – Prédio 22 – 5º andar – São José - Canoas									

4. IDENTIFICAÇÃO DO PESQUISADOR COLABORADOR									
Nome: Paulo Cezar Schütz									
Profissão: Médico			Registro no CREMERS: 15175			E-mail: pauloschutz@terra.com.br			
Endereço: Av. Farroupilha, 8001 – Prédio 22 – 5º andar – São José - Canoas									

1. Da justificativa e dos objetivos para realização desta pesquisa

A osteoartrose é uma doença incapacitante que afeta principalmente as articulações do quadril, joelho, coluna e mãos, cujas causas ainda não são bem conhecidas.

O projeto de pesquisa acima citado pretende estudar fatores genéticos associados à osteoartrose de joelho e/ou quadril, procurando esclarecer se fatores genéticos podem influenciar o desenvolvimento da osteoartrose.

2. Do objetivo de minha participação

Minha participação no projeto poderá ajudar em maior conhecimento das causas da osteoartrose e descobrir sinais de como ela pode evoluir em cada pessoa.

3. Do procedimento para coleta de amostras

Será feita uma coleta de 5ml de sangue. Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o meu tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).

Além da coleta será realizada uma entrevista com objetivo de caracterizar fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da osteoartrose.

Esta coleta será realizada no momento da consulta com o médico e não envolverá qualquer prejuízo no atendimento, bem como não resultará em despesas ao participante.

4. Da utilização, armazenamento e descarte das amostras

A amostra de sangue será utilizada para estudos que procuram determinar as causas genéticas da dor osteoartrose. Desta amostra será extraído o DNA das células e este ficará armazenado no Laboratório de Genética Molecular Humana do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil (Av. Farroupilha, 8001 – prédio 22 – 5º andar – Canoas/RS).

A utilização deste material em outras pesquisas:

() poderá ser realizada sem a necessidade de que o pesquisador responsável entre em contato comigo novamente.

() poderá ser realizada somente se o pesquisador responsável entrar em contato novamente.

() não poderá ser realizada.

5. Dos desconfortos e dos riscos

Estou ciente de que não há riscos ou desconforto resultantes da minha participação no estudo, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).

6. Dos benefícios

Não há benefício direto para o participante. Tendo em vista que este é um projeto de pesquisa básica, os resultados deste estudo poderão contribuir para o avanço do conhecimento científico, mas sem benefícios diretos para os participantes.

7. Da isenção e ressarcimento de despesas

A minha participação no estudo é isenta de despesas, não acarretando qualquer ônus pecuniário com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo.

8. Da forma de acompanhamento e assistência

Estou ciente de que terei direito à assistência, tratamento e indenização por eventuais danos, efeitos colaterais e reações adversas decorrentes de sua participação na presente pesquisa.

9. Da liberdade de recusar, desistir ou retirar meu consentimento

Tenho a liberdade de recusar, desistir ou de interromper a colaboração nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação. A minha desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento que recebo neste serviço médico.

10. Da garantia de sigilo e de privacidade

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas poderão ser divulgados em publicações científicas, desde que os dados pessoais não sejam mencionados.

11. Da garantia de esclarecimento e informações a qualquer tempo

Estou ciente de que tenho a garantia de tomar conhecimento e obter informações, a qualquer tempo, dos procedimentos e métodos utilizados neste estudo, bem como dos resultados, parciais e finais, desta pesquisa. Para tanto, poderá consultar o **pesquisador responsável** (Daniel Simon) ou o **Comitê de Ética em Pesquisa da ULBRA Canoas(RS)**, com endereço na Av. Farroupilha, 8001 – Prédio 14 – Sala 224, bairro São José, telefone (51) 3477-9217, e-mail comitedeetica@ulbra.br.

Declaro que obtive todas as informações necessárias e esclarecimento quanto às dúvidas por mim apresentadas e, por estar de acordo, assino o presente documento em duas vias de igual conteúdo e forma, ficando uma em minha posse.

_____, ____ de _____ de _____.

Pesquisador Responsável pelo Projeto

Sujeito da pesquisa e/ou responsável

Testemunhas:

Nome:
RG:
CPF/MF:
Telefone:

Nome:
RG:
CPF/MF:
Telefone:

Anexo 2

PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO

Bases genéticas da degeneração da cartilagem articular

Ficha nº: _____

Nome: _____

Idade: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

Raça: (1) B (2) M (3) N (4) _____

Ascendência: Avós Paternos _____

Avós Maternos _____

Endereço: _____

Bairro: _____

Cidade: _____ Estado _____

Telefone: Residencial (____) _____ Celular (____) _____

Peso _____ Altura _____

Índice de massa corporal _____

Queixa principal: _____

Localização da dor: () Quadril () Esq () Dir

() Joelho () Esq () Dir

Início dos sintomas: _____

() Quadril () Esq () Dir

() Joelho () Esq () Dir

Duração da crise: _____

Intensidade (EVA 1 a 10): _____

Sintomas associados: _____

Fatores que pioram: _____

Fatores que aliviam: _____

Medicação: (a) Aines/Miorrelaxantes _____ (1) (2) (3) (4)

(b) Deriv. Opiáceos: _____ (1) (2) (3) (4)

(c) Esteróides: _____ (1) (2) (3) (4)

História clínica: _____

Atividade profissional: _____

() ortostatismo _____hs/dia.

Atividade física prévia: () sedentário

() prática esportiva () vezes por semana

Tipo de atividade: _____durante _____ meses.

Fatores de risco:

Fumo: (1) Sim (2) Não

Se sim _____cigarros/dia, durante _____anos.

Sobrepeso corporal: () sim () não IMC _____

Cargas repetitivas () sim () não _____hs/dia.

Diminuição de força () sim () não

Densidade mineral óssea alterada: () sim () não _____ valor

Histórico familiar da doença: () sim () não

Pais: _____

Irmãos: _____

Outros: _____

Exame Físico:

Inspeção:

() atitude em flexo

() rotação externa do quadril

() claudicação

() varismo o joelho

() valgismo do joelho

() discrepância de membro

Trofismo muscular: Coxa D _____ Coxa E _____

Outros achados: _____

Exames Complementares:

RX

Quadril Direito	Quadril esquerdo	Joelho direito	Joelho esquerdo
() normal	() normal	() normal	() normal

() I Kellgren Lawrence	() I Kellgren Lawrence	() I Kellgren Lawrence	() I Kellgren Lawrence
() II Kellgren Lawrence	() II Kellgren Lawrence	() II Kellgren Lawrence	() II Kellgren Lawrence
() III Kellgren Lawrence	() III Kellgren Lawrence	() III Kellgren Lawrence	() III Kellgren Lawrence
() IV Kellgren Lawrence	() IV Kellgren Lawrence	() IV Kellgren Lawrence	() IV Kellgren Lawrence

Joelho direito	Joelho esquerdo
() unicompartimental medial	() unicompartimental medial
() unicompartimental lateral	() unicompartimental lateral
() bicompartimental	() bicompartimental
() pancompartimental	() pancompartimental

Exames laboratoriais: _____

Outros: _____

Tratamentos prévios: _____

Tratamento proposto: _____

Anotações: _____

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)