

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MIRELLA VALERIO CUNHA

INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO NA  
MMP-1 (-1607) NA TENDINOPATIA PRIMÁRIA  
DO TIBIAL POSTERIOR.

CURITIBA

2012

MIRELLA VALERIO CUNHA

INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO NA  
MMP-1 (-1607) NA TENDINOPATIA PRIMÁRIA  
DO TIBIAL POSTERIOR.

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Biologia Celular como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos

CURITIBA

2012

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço primeiramente à Deus por ter me guiado até aqui.

Muito obrigada aos meus pais e irmãos pelo apoio incondicional ao longo dessa jornada e também aos amigos, que sempre se fizeram presentes, contribuindo para que este momento chegasse.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cristina, com a qual trabalhei desde da monitoria até agora, na elaboração da monografia, agradeço pela oportunidade.

## RESUMO

As metaloproteases da matriz desempenham um papel fundamental na destruição tecidual e participam de diversos processos degenerativos. Polimorfismos são um mecanismo pelo qual os indivíduos podem exibir uma pequena variação genética considerada biologicamente normal e podem tornar um indivíduo mais ou menos suscetível a uma determinada patologia. Polimorfismos em gene de metaloproteases já foram associados a diversas doenças, inclusive a patologias de tendões. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do polimorfismos na região promotora do gene da MMP-1 (-1607) na tendinopatia primária do tendão tibial posterior. Os voluntários foram divididos em dois grupos: teste, 50 pacientes submetidos a procedimento cirúrgico e com diagnóstico anatomopatológico de lesão degenerativa do tendão tibial posterior; controle, 100 pacientes com tendão tibial posterior íntegro e sem sinais de degeneração. O DNA dos voluntários foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, através de extração com acetato de amônia. Técnicas de PCR e RFLP foram utilizadas para análise dos genótipos. A análise estatística dos resultados foi realizada pelo Teste Qui-Quadrado com nível de significância de 5%. Os resultados mostram que os polimorfismos -1607 da MMP-1 está relacionado com risco maior para tendinopatia primária do tendão tibial posterior.

## **ABSTRACT**

The matrix metalloproteases play an important role in tissue destruction and participate in many degenerative processes. Gene polymorphisms are a mechanism by which individuals may exhibit variations within the range of what is considered biologically normal and may make an individual more or less susceptible to a particular pathology. Polymorphisms in metalloproteases genes have been associated with several pathologies, including disorders of tendons. The aim of this study was to investigate the influence of polymorphisms in the promoter region of the gene of metalloproteinases 1 (-1607) in physiopatology of primary posterior tibial tendon insufficiency. The sample of 150 selected patients was divided into test group, 50 patients undergoing surgical procedures and pathological diagnosis of degenerative lesions of the posterior tibial tendon, and control group, 100 patients with posterior tibial tendon intact and no signs of degeneration. The DNA of the volunteers was obtained from oral mucosa epithelial cells, by extraction with ammonium acetate. PCR and RFLP were used for analysis of genotypes. Statistical analysis of results was performed by Chi-squared test with significance level of 5%. The results show that polymorphisms -1607 of MMP-1 is associated with increased risk for primary tendinopathy of the posterior tibial tendon.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>7</b>
3.1. Análise de Polimorfismos Genéticos	9
3.1.1. Obtenção de DNA	9
3.1.2. Extração de DNA	9
3.1.3. Reação da PCR	10
3.1.4. Determinação do Genótipo	10
3.1.5. Eletroforese	11
3.2. Análise Estatística dos Resultados	11
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>12</b>
4.1. Amostras	12
4.2. MMP-1	13
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>15</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>18</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>19</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O tendão tibial posterior é o inversor primário do retropé e do complexo articular subtalar, no início do desprendimento do pé do solo, durante a fase de apoio do ciclo da marcha. Participa ainda da flexão plantar do tornozelo, é o antagonista primário dos tendões fibulares e o estabilizador dinâmico do arco longitudinal medial do pé (MANN, 1993).

A insuficiência do tendão tibial posterior é reconhecida como principal etiologia do pé plano adquirido do adulto, causando significativa perda funcional, dor e osteoartrose secundária das articulações do retropé. O maior entendimento desta condição, durante os últimos 25 anos, resulta do aumento expressivo dos estudos focados nas ciências básicas e no conhecimento da fisiopatogenia dessa síndrome clínica (POMEROY *et al.*, 1999).

Avanços significativos em estudos histopatológicos e técnicas de investigação por imagem contribuíram para o melhor entendimento da fisiopatologia das degenerações tendíneas. A literatura demonstra que características individuais podem predispor a tendinopatias, indicando que fatores intrínsecos ao hospedeiro desempenham um papel importante. Isso sugere que existe um grupo de indivíduos com risco maior de desenvolver patologias do tendão. Na verdade, evidências comprovam que polimorfismos genéticos podem influenciar as degenerações tendíneas. Entretanto, a literatura traz poucos estudos que analisaram essa influência, limitando-se a analisar um pequeno grupo de genes.

Desde que a reação inflamatória é o ponto chave para o estabelecimento de tendinopatia, e, tendo em vista que a diferenciação e função das células são dependentes de mediadores inflamatórios, torna-se importante estudar os fatores genéticos que determinam a expressão desses elementos biológicos. Dentre eles as metaloproteases da matriz que desempenham papel fundamental na destruição tecidual e podem exercer função significativa na patogênese das tendinopatias.

A determinação desses padrões genéticos, em pacientes com tendinopatias primárias do tendão tibial posterior, possibilita a identificação de indivíduos com maior risco de desenvolver essa doença, bem como aqueles suscetíveis à falha na regeneração.

Dessa forma, marcadores genéticos podem ser identificados, contribuindo para elaboração de estratégias de prevenção e terapêutica individualizadas, visando modular os marcadores genéticos e aumentar a taxa de sucesso dos tratamentos.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Degenerações dos tendões são comuns e constituem problema frequente na prática médica. Alguns tendões são particularmente vulneráveis e usualmente apresentam alteração degenerativa primária como o patelar, o calcâneo, os do manguito rotador, o do bíceps do braço, o tibial posterior e os fibulares (RILEY, 2004).

Avanços significativos dos estudos histopatológicos e das técnicas de investigação por imagem contribuem para o melhor entendimento da fisiopatogenia das degenerações tendíneas (JAMES *et al.*, 1978; JOHNSON *et al.*, 1983; SATOMI *et al.*, 2008). Entretanto, os conhecimentos dos fatores mecânicos, vasculares e neurológicos apresentam alcance limitado na explicação etiológica de muitos casos (ROLF, MOVIN, 1997; MCLAUCHLAN, HANDOLL, 2001; RILEY, 2004).

Características individuais podem influenciar o desenvolvimento de tendinopatias, entre elas, a herança genética (MOKONE *et al.*, 2005). Assim, parece existir um grupo de indivíduos com carga genética que lhes confere maior suscetibilidade para desenvolver doenças do tendão (POSTHUMUS *et al.*, 2009; COLLINS; RALEIGH, 2009).

Polimorfismos são pequenas variações genéticas nas quais um ou mais alelos têm frequência gênica maior que 1% (THOMPSON *et al.*, 1991). Aproximadamente 90% dos polimorfismos de DNA são polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs- Single Nucleotide Polymorphisms*), devido a uma troca ou inserção/deleção de uma única base (RA, PARK, 2007). Embora os polimorfismos de DNA, em sua maioria, sejam funcionalmente neutros, uma parte deles pode exercer efeito alelo específico na regulação da expressão gênica ou função das proteínas codificadas e, assim, tornar um indivíduo mais ou menos suscetível a uma determinada doença (YE, 2000). Polimorfismos em região promotora podem influenciar a regulação transcricional de proteínas,

como as metaloproteases da matriz (CARGILL *et al.*, 1999) e já estão relacionados a diversas doenças (KERRIGAN *et al.*, 2000; YAMADA *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003).

As metaloproteases (MMPs) representam a maior classe de enzimas responsável pelo metabolismo da matriz extracelular (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993), contribuindo para degradação e remodelação do colágeno de tecidos lesados. Elas são secretadas por células inflamatórias em resposta a estímulos como citocinas e lipopolisacarídeos e desempenham papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos. Apesar de possuírem grande semelhança estrutural apresentam diferentes subclasses como as colagenases intersticiais, gelatinases, estromelinas, MMP de membrana, além da matrilisina, metaloelastase e enamelisina. Esta classificação é baseada na especificidade ao substrato (KERRIGAN *et al.*, 2000).

MMP-1, também chamada de colagenase-1, apresenta um proeminente papel na degradação específica do colágeno tipo I, o maior componente da matriz extracelular, bem como outros tipos de colágenos: II, III, V, IX (ZIOBER *et al.*, 2000; KERKELA, SAARIALHO KERE, 2003) e o colágeno tipo X em pH neutro (VINCENTI *et al.*, 1996). Como eles são os mais abundantes componentes da matriz extracelular, a MMP-1 é crítica para a degradação e remodelagem dos tecidos (VINCENTI *et al.*, 1996).

Ela é expressa em uma ampla variedade de células normais, como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, condrócitos, osteoblastos e osteoclastos e em várias células tumorais (BRINCKERHOFF *et al.*, 2000). Em condições fisiológicas normais, a MMP-1 é expressa em baixos níveis (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993). No entanto, sua expressão pode aumentar significativamente em condições patológicas.

O aumento da expressão de MMP-1 é associado a um prognóstico reservado em vários tipos de neoplasias, como: câncer colorretal (WOO *et al.*, 2007), câncer de bexiga (TASCI *et al.*, 2008), carcinoma oral (SHIMIZU *et al.*,

2008; NISHIZAWA *et al.*, 2007), carcinoma de nasofaringe (NASR *et al.*, 2007) e também em outros processos patológicos, como: doença arterial coronariana (HORNE *et al.*, 2008), doença arterial obstrutiva periférica (FLEX *et al.*, 2007) e soltura precoce de prótese do quadril. (GODOY-SANTOS *et al.*, 2009).

O nível de expressão das MMPs pode ser influenciado por diferentes polimorfismos na região promotora. O gene da MMP-1 está localizado no cromossomo 11 (11q22.3); uma inserção/deleção de uma guanina na posição -1607 do gene da MMP-1 cria dois alelos diferentes: um com uma única guanina (1G) e outro com duas (2G) (RUTTER *et al.*, 1998). Rutter *et al.* (2009) indicam que este é um polimorfismo funcional.

Este polimorfismo é associado à suscetibilidade para diversas doenças e alterações fisiológicas, como neoplasias (YE, 2000; CAO, LI, 2006; NISHIZAWA *et al.*, 2007; TASCI *et al.*, 2007; WOO *et al.*, 2007; CHAUDHARY *et al.*, 2010; ALTAS *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011), doença degenerativa do disco intervertebral (SONG *et al.*, 2008), tuberculose endobrônquica (KUO *et al.*, 2008), artrite reumatoide (MASSAROTTI *et al.*, 2002), arteriosclerose (ORBE *et al.*, 2003), surdez súbita (NAM *et al.*, 2011), glioblastoma multiforme (MALIK *et al.*, 2011), periodontite (SOUZA *et al.*, 2003), falha na osseointegração de implantes (SANTOS *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2008), doença coronária (DRZEWOSKI *et al.*, 2008) e fibrose pulmonar (WANG *et al.*, 2010).

Uma vez que a MMP-1 é capaz de degradar uma grande quantidade de proteínas extracelulares e influenciar degradação e remodelação de tecidos injuriados, o estudo desse gene pode ser importante para uma melhor compreensão do processo de degeneração tendínea. A determinação desses padrões genéticos, em pacientes com tendinopatias possibilitaria a identificação de indivíduos com maior risco a desenvolver essa patologia, bem como aqueles susceptíveis à falha na regeneração. Dessa forma, marcadores genéticos poderão ser identificados, contribuindo para uma seleção pré-operatória adequada e para elaboração de estratégias de prevenção e

terapêutica individualizadas visando modular os marcadores genéticos e aumentar a taxa de sucesso dos tratamentos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

O protocolo foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) sob o número 708, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPESQ) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 0901/09.

Esse estudo foi realizado mediante parceria do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e o Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Após explicação do trabalho e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os voluntários foram recrutados entre os pacientes do Grupo de Pé e Tornozelo do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Estes pacientes foram identificados segundo idade, gênero, índice de massa corpórea, diagnóstico da doença, uso de medicamentos, antecedentes pessoais de doenças sistêmicas e infecciosas, antecedentes familiares de doenças inflamatórias e informação sobre a presença prévia de pé plano.

Foram divididos em dois grupos:

- **Grupo-Teste:** 50 pacientes com diagnóstico clínico e anatomopatológico de lesão degenerativa primária do tendão tibial posterior.
- **Grupo-Controle:** 100 pacientes assintomáticas e com tendão tibial posterior íntegro na ressonância magnética, sendo esta realizada na investigação de outra patologia.

Uma vez que degeneração no tibial posterior são três vezes mais frequentes em mulheres (DELAND *et al.*, 2005) foram selecionados para somente indivíduos femininos para ambos os grupos.

Pacientes de ambos os grupos apresentaram boas condições sistêmicas e ausência dos critérios descritos no quadro 1.

Doenças reumatológicas
Doenças imunológicas
Diabetes
Doenças hepáticas e renais
Infecção ou lesão prévia ou atual na topografia do pé e tornozelo
Obesidade superior ao grau I
Gênero masculino

Quadro 1 - Critérios de exclusão de pacientes no estudo.

O estudo do polimorfismo genético foi realizado no Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná. O grupo de pesquisadores de processamento do material celular não teve conhecimento do grupo ao qual fazia parte o voluntário.

### **3.1. Análise de Polimorfismos Genéticos**

#### **3.1.1. Obtenção de DNA**

A coleta de DNA foi realizada na Universidade do Estado de São Paulo. O DNA dos pacientes foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, por meio de um bochecho com 3 ml de solução autoclavada de glicose a 3% (concentração isomolar com a saliva) durante 2 minutos (TREVILATTO, LINE, 2000). O bochecho foi escolhido como a técnica de obtenção do material de estudo, pois constitui o método menos invasivo e mais prático de obtenção do DNA. Nesta solução, foi adicionado 1 ml de solução *TNE* (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl e 2 mM *EDTA*) e então centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm, para coleta da fase celular. Para a suspensão das células, foi acrescentado 1,3 ml de solução de extração (Tris-Cl a 10 mM, (pH 7,8), *EDTA* a 5 mM e SDS a 0,5%) e as amostras foram congeladas a -20°C até o momento de extração do DNA.

#### **3.1.2. Extração de DNA**

A extração do DNA foi realizada na Universidade Federal do Paraná conforme protocolo de Aidar & Line (2007). As amostras foram incubadas durante 16 horas com 20 µg/ml de proteinase K (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA*) a 56 °C. Foram adicionados 500 µl de solução de acetato de amônio

10mM com EDTA 1mM e agitado em aparelho de vortex por 5 segundos. Após centrifugação a 17000g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e foram adicionados 540 ul de isopropanol para cada 900 ul da solução contendo DNA. Após centrifugação, o sobrenadante foi submetido à lavagem com etanol a 70% e seco por 15 minutos a 37°C. O DNA foi realizada suspensão em 100 ul de tampão *TE* (Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8), EDTA a 1 mM) a temperatura ambiente por três horas.

### **3.1.3. Reação da PCR**

PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foi utilizada para amplificação do fragmento da região reguladora do gene da MMP-1. A reação de PCR teve um volume final de 10 ul, contendo aproximadamente 400 ng de DNA, *taq Green* (Amersham Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden) e os seguintes primers:

- Forward: TCGTGAGAATGTCTTCCCATT

- Reverse: TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC.

Uma mistura com todos os reagentes foi submetida a uma desnaturação inicial por 3 minutos; seguida de trinta e cinco ciclos com desnaturação a 95°C, anelamento a 55°C e extensão a 72°C, 30 segundos em cada temperatura; seguido de um extensão final a 72°C por 5 minutos.

### **3.1.4. Determinação do Genótipo**

O fragmento amplificado foi submetido à digestão por enzimas de restrição para gerar fragmentos menores (RFLP - *Restriction Fragment Length*



*Polymorphism*). A digestão foi realizada com volume final de 10 ul, por 16 h a 37°C com a enzima *XmnI* (*New England Biolabs inc*).

### **3.1.5. Eletroforese**

As seqüências amplificadas (PCR) e digeridas (RFLP) foram analisadas por eletroforese em géis verticais de poliacrilamida a 10% em TBE 1x (89 mM de Tris-Borato, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA). Cinco microlitros de PCR ou o produto de digestão foram adicionados a 0,3 ul de GelRed™ (Unisciences). Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 15 mA.

## **3.2. Análise Estatística dos Resultados**

A associação entre polimorfismos genéticos e o grau de predisposição à tendinopatia primária foi avaliada através do teste Qui-Quadrado, pelo software BioEdit, ao nível de significância de 5%.

O programa ARLEQUIN (v. 2.0 – Schneider et al., 2000) foi utilizado para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra estudada.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Amostras

Respeitados os critérios de inclusão e não inclusão, a amostra foi obtida por conveniência e composta por 150 mulheres, 50 indivíduos no grupo-teste submetidos a procedimento cirúrgico e com diagnóstico clínico e anatomopatológico de lesão degenerativa primária do tendão tibial posterior e 100 indivíduos no grupo-controle com tendão tibial posterior íntegro e sem sinais de degeneração na ressonância magnética, realizada como investigação diagnóstica de queixa em outra topografia do tornozelo e pé.

A idade dos pacientes dos grupos da amostra, considerada como variável independente, contínua e com distribuição não normal, foi analisada através do teste U de *Mann Whitney*, que não identificou diferença estatística ( $p=0,0839$ ) entre os dois grupos estudados.

Os dados de índice de massa corpórea de ambos os grupos foram identificados conforme o sistema de classificação em indivíduo normal (de 18,5 a 24,9) ou indivíduo com obesidade grau I (de 25,0 a 29,9). Considerados como variável independente, categórica e com distribuição não normal, foram analisados através do teste exato de *Fisher*, que não identificou diferença estatística significativa ( $p=0,721$ ) entre os dois grupos estudados; excluindo interferência da massa corpórea como fator de risco a tendinopatia na população estudada.

A média de idade e a distribuição do índice de massa corpórea (IMC) da amostra estudada estão representadas no quadro 2.

Parâmetros	Controle (n = 100)	Teste (n = 50)
Média de idade	51,76 anos (47-56)	53,06 anos (48-56)
IMC	61(normal)/ 39(obesidade grau I)	33(normal)/ 17(obesidade grau I)

Quadro 2 - Média de idade e distribuição por faixa de IMC da amostra nos grupos de estudo.

## 4.2. MMP-1

O polimorfismo do gene da MMP-1 na posição -1607 é caracterizado pela inserção de uma base guanina (G), criando dois alelos diferentes (1G ou 2G). O alelo 2G está relacionado com o aumento da expressão desse gene (RUTTER *et al.*, 1998). A enzima de restrição *XmnI* reconhece o alelo 1G e na presença deste o produto de *PCR* (118 pares de bases) é digerido em duas partes (89 e 29 pares de bases). Na eletroforese, o alelo 2G foi representado por uma banda de DNA de 118 pares de bases, o alelo 1G por uma banda de DNA de 89 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (118 e 89 pares de bases). Durante a eletroforese, a banda com 29 pares de bases saía do gel. A figura 1 mostra os fragmentos amplificados e digeridos da MMP-1 (-1607), caracterizando os diferentes genótipos.

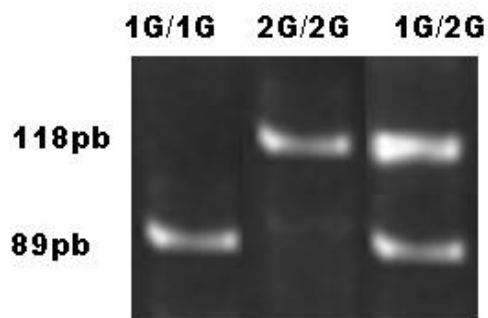


Figura 1: Os três genótipos da MMP-1 (-1607) encontrados nos pacientes do estudo.

A análise do polimorfismo -1607 do gene da MMP-1 indica diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

Enquanto no grupo-controle 75% dos voluntários apresentaram alelo 1G, no grupo-teste o alelo 2G apareceu em 78% dos pacientes. O genótipo 1G/1G foi o mais frequente no grupo-controle (62%), enquanto o genótipo 2G/2G foi o mais frequente no grupo-teste (72%), como demonstra o quadro 3.

<b>MMP-1</b>	<b>Grupo-Controle</b>		<b>Grupo-Teste</b>		<b>Qui-Quadrado</b>
(-1607)	n	%	n	%	
Alelos	N = 200		n = 100		p < 0,001
1G	150	75	22	22	
2G	50	25	78	78	
Genótipos	N = 100		n = 50		p < 0,001
1G/1G	62	62	08	16	
2G/2G	12	12	36	72	
1G/2G	07	07	06	12	

Quadro 3: Frequência dos alelos e genótipos do polimorfismo -1607 do gene da MMP-1 nos pacientes analisados.

## 5. DISCUSSÃO

Os estudos genéticos relacionados a tendinopatias publicados na literatura apresentam análise da correlação de polimorfismos nos genes que expressam o colágeno tipo V (*COL5A1*), a tenascina-C, o colágeno tipo I (GT), o fator transformador de crescimento beta 1 (*TGF-β1*) variante rs1800469 e o fator 5 de diferenciação de crescimento (*GDF-5*) variante rs143383, com alterações do tendão calcâneo, mas não em relação ao tendão tibial posterior (MOKONE *et al.*, 2005; MOKONE *et al.*, 2006; POSTHUMUS *et al.*, 2009; COLLINS; RALEIGH, 2009; POSTHUMUS; COLLINS, 2010).

Esse estudo faz parte de uma linha de pesquisa genética ampla que envolve a análise de diversos genes e sua relação com a tendinopatia primária do tibial posterior, e é realizado pela parceria entre o Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e o Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O interesse do grupo envolvido nessa linha de pesquisa é catalogar diferentes polimorfismos relacionados à tendinopatia primária, uma vez que o perfil genômico permite definir um banco de marcadores genéticos para suscetibilidade a tendinopatia primária do tendão tibial posterior.

Os resultados demonstram que o método de extração de DNA utilizado foi adequado para obtenção de quantidades suficientes de DNA. A amplificação dos fragmentos por técnica de *PCR* teve suas condições otimizadas e a escolha da enzima de restrição para a técnica de *RFLP* foi adequada para a análise do polimorfismo estudado. Assim, com uma metodologia reprodutível, de baixo custo e pouco invasiva, foi possível identificar um marcadores moleculares para pacientes com tendinopatia primária do tendão tibial posterior.

O presente estudo obteve um banco de DNA de 150 indivíduos, sendo 50 pacientes com lesão degenerativa do tendão tibial posterior e 100 com tendão tibial posterior íntegro. Esse banco é resultado de critérios rígidos na obtenção da amostra, visando diminuir a influência de fatores sistêmicos que podem mascarar ou acentuar o real papel dos polimorfismos genéticos na fisiopatogenia dessa tendinopatia.

O polimorfismo estudado no gene da MMP-1 apresenta equilíbrio de Hardy-Weinberg, garantindo, assim, que a distribuição genotípica ocorreu ao acaso. O equilíbrio de Hardy-Weinberg é a base da genética de populações e define que em uma população mendeliana dentro de condições normais, as frequências alélicas permanecerão constantes ao passar das gerações. A teoria de que alelos raros se tornam cada vez mais raros e que alelos frequentes aumentem cada vez mais sua frequência, simplesmente por já serem raros ou comuns, é matematicamente refutada pelo princípio de Hardy-Weinberg.

Esse estudo mostra que o polimorfismo na região promotora do gene da MMP-1 (posição -1607) está fortemente associado à tendinopatia primária do tendão tibial posterior. O alelo 2G foi observado em uma frequência significativamente maior nos pacientes com diagnóstico anatomopatológico de lesão degenerativa do tendão tibial posterior (78% no grupo-teste *versus* 25% no controle).

Uma vez que o colágeno tipo I é o componente principal da matriz extracelular do tendão e sua degradação é considerada um dos fatores-chave nas lesões destrutivas descontroladas, fica evidente o papel da MMP-1 nesse processo uma vez que esta enzima é eficiente para iniciar a degradação do colágeno tipo I (SORSA *et al.*, 2006). Embora esta MMP-1 exerça seu papel principal na degradação da matriz, ela também pode modular a resposta inflamatória e imune (KUULA *et al.*, 2009, KORPI *et al.*, 2009). O desequilíbrio na produção da MMP-1 em paciente com o alelo 2G, onde esse alelo aumenta a transcrição do gene e potencializa o nível da expressão dessa proteína

(RUTTER *et al.*, 1998), fornece a base molecular para explicar uma intensa degradação do colágeno tipo I e uma resposta inflamatória exacerbada, criando condições que acentuam a tendinopatia.

Na verdade, a tendinopatia, como em qualquer processo multifatorial (MICHALOWICZ *et al.*, 2000), parece ser a combinação de vários polimorfismos de risco significativo agindo sinergicamente que eleva a suscetibilidade à falha. Uma vez que as MMPs têm um papel chave na degeneração de tendão e que a descoberta de marcadores genéticos relacionados à tendinopatia possibilita a identificação de indivíduos susceptíveis; a análise de polimorfismos em MMPs relacionados à tendinopatia primária é de um valor clínico inestimável.

No futuro, a investigação de outros marcadores genéticos poderá definir e padronizar todos os genes de risco para essa doença e, assim, criar condições adequadas para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas individualizadas, como, por exemplo, o uso dos inibidores de MMPs de baixo peso molecular para pacientes susceptíveis à insuficiência do tendão tibial posterior.

## **6. Conclusão**

Foi obtido um banco de DNA de 150 pacientes do Grupo de Pé e Tornozelo do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Através desse banco, diversos estudos associando fatores genéticos relacionados à tendinopatia poderão ser realizados, possibilitando descobertas de novos marcadores moleculares.

O polimorfismo na posição -1607 do gene da MMP-1 esta associado com a tendinopatia primária do tendão tibial posterior na população estudada. Os resultados apresentados sugerem um papel ativo dessa MMP na degeneração do tendão, onde indivíduos com o alelo 2G parecem ter um risco maior a tendinopatias primárias. Portanto, esse polimorfismo pode ser usado como marcador genético de susceptibilidade a tendinopatia primária do tendão tibial posterior.



## 7. Referências

AIDAR, M.; LINE, S.R. **A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells.** *Braz Dent J.* 2007;18:148-52.

ALTAŞ, M. *et al.* **The effect of polymorphisms in the promoter region of the MMP-1 gene on the occurrence and invasiveness of hypophyseal adenoma.** *Acta Neurochir (Wien).* 2010;152(9):1611-7.

BIRKEDAL-HANSEN, H. **Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases.** *J Periodontol.* 1993; 64: 474-484.

BIRKEDAL-HANSEN, H. *et al.* **Matrix metalloproteinases: a review.** *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4:197-250.

BRINCKERHOFF, C.E.; RUTTER, J.L.; BENBOW, U. **Interstitial collagenases as markers of tumor progression.** *Clin Cancer Res.* 2000;6:4823-30.

CAO, Z.G.; LI, C.Z. **A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances oral squamous cell carcinoma susceptibility in a Chinese population.** *Oral Oncol.* 2006;42:32-8.

CARGILL, M. *et al.* **Characterization of single-nucleotide polymorphism in coding regions of human genes.** *Nat Genet.* 1999;22:231-8.

CHAUDHARY, A.K. *et al.* **Functional polymorphism of the MMP-1 promoter (-1607 1G/2G) in potentially malignant and malignant head and neck lesions in an Indian population.** *Biomarkers.* 2010;15(8):684-92.

CHAUDHARY, A.K. *et al.* **Synergistic effect of stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) promoter (-1171 5A->6A) polymorphism in oral submucous fibrosis and head and neck lesions.** *BMC Cancer.* 2010;10:369.

COLLINS, M.; RALEIGH, S.M. **Genetic risk factors for musculoskeletal soft tissue injuries.** *Med Sport Sci.* 2009;54:136–49.

DELAND, J.T. *et al.* **Posterior tibial tendon insufficiency: which ligaments are involved?** *Foot Ankle Int.* 2005;26:427-35.

DRZEWOSKI, J. *et al.* **Gene polymorphisms and antigen levels of matrix metalloproteinase- 1 in type 2 diabetes mellitus coexisting with coronary heart disease.** *Kardiol Pol.* 2008;66:1042-8.

FLEX, A. *et al.* **Proinflammatory genetic profiles in subjects with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischemia.** *J Int Med.* 2007;262:124-30.

GODOY-SANTOS, A.L. *et al.* **Aseptic loosening of total hip arthroplasty: preliminary genetic investigation.** *J Arthroplasty.* 2009;24(2):297-302.

HORNE, B.D. *et al.* **Usefulness of routine periodic fasting to lower risk of coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography.** *Am J Cardiol.* 2008;102:814-9.

JAMES, S.L.; BATES, B.T.; OSTERNIG, L.R. **Injuries to runners.** *Am J Sports Med.* 1978;6:40-50.

JOHNSON, K.A. **Tibialis posterior tendon rupture.** *Clin Orthop.* 1983;177:140-7.

KERKELA, E.; SAARIALHO-KERE, U. **Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer.** *Exp Dermatol.* 2003;12:109-25.

KERRIGAN, J.J.; MANSELL, J.P.; SANDY, J.R. **Matrix turnover.** *J. Orthod.* 2000; 27: 227-233.

KORPI, J.T. *et al.* **Healing of extraction sockets in collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice.** *Eur J Oral Sci.* 2009;117:248-54.

KUO, H.P. *et al.* **Matrix metalloproteinase-1 polymorphism in Taiwanese patients with endobronchial tuberculosis.** *Tuberculosis.* 2008;88 262-7.

KUULA, H. *et al.* **Local and systemic responses in matrix metalloproteinase 8-deficient mice during Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis.** *Infect Immun.* 2009 Feb;77(2):850-9.

LEITE, M.F.F. *et al.* **Osseintegrated implant failure associated with MMP-1 promoter polymorphisms (-1607 and -519).** *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008;23:653-8.

LIU, L. *et al.* **A functional polymorphism (-1607 1G→2G) in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with development and progression of lung cancer.** *Cancer.* 2011;117:5172-81.

MALIK, N. *et al.* **Association of matrix metalloproteinase-1 gene polymorphism with glioblastoma multiforme in a northern Indian population.** *J Neurooncol.* 2011;102(3):347-52.

MANN, R.A. **Flatfoot in Adults.** In: Mann RA, Coughlin MJ, editors. *Surgery of the foot and ankle.* St Louis: C. V. Mosby; 1993. p.757-84.

MASSAROTTI, M. *et al.* **Polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter gene and severity of rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol.* 2002;29:2241-2.

MCLAUCHLAN, G.J.; HANDOLL, H.H.G. **Interventions for treating acute and chronic Achilles tendinitis.** *Cochrane Database Syst Rev.* 2001;2:CD000232.

MICHALOWICZ, B.S. *et al.* **Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis.** *J Periodontol.* 2000; 71: 1699-1707.

MOKONE, G.G. *et al.* **The guanine-thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C gene is associated with Achilles tendon injuries.** *Am J Sports Med.* 2005;33(7):1016-21.

MOKONE, G.G. *et al.* **The COL5A1 gene and Achilles tendon pathology.** *Scand J Med Sci Sports.* 2006;16(1):19-26.

NAM, S.I. *et al.* **A polymorphism at -1607 2G in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) increased risk of sudden deafness in Korean population but not at -519A/G in MMP-1.** *Laryngoscope.* 2011;121(1):171-5.

NASR, H.B. *et al.* **Matrix metalloproteinase-1 (-1607) 1G/2G and -9 (-1562) C/T promoter polymorphisms: susceptibility and prognostic implications in nasopharyngeal carcinomas.** *Clin Chim Acta.* 2007;384:57-63.

NISHIZAWA, R. *et al.* **The 2G allele of promoter region of matrix metalloproteinase-1 as an essential pre-condition for the early onset of oral squamous cell carcinoma.** *BMC Cancer.* 2007;7:187.

ORBE, J. *et al.* **Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed.** *Atherosclerosis*. 2003;170:269-76.

PARK, K.S. *et al.* **Clinical characteristics of TIMP2, MMP2, and MMP9 gene polymorphisms in colorectal cancer.** *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(2):391-7.

POMEROY, G.C. *et al.* **Current concepts Rreview - acquired flatfoot in adults due to dysfunction of the posterior tibial tendon.** *J Bone Joint Surg Am*. 1999;81-A:1173-82.

POSTHUMUS, M. *et al.* **Components of the transforming growth factor-beta family and the pathogenesis of human Achilles tendon pathology--a genetic association study.** *Rheumatology* (Oxford). 2010;49(11):2090-7.

POSTHUMUS, M. *et al.* **Genetic risk factors for anterior cruciate ligament ruptures: COL1A1 gene variant.** *Br J Sports Med*. 2009;43:352-6.

POSTHUMUS, M. *et al.* **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.

POSTHUMUS, M. *et al.* **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.

RA, H.J.; PARKS, W.C. **Control of matrix metalloproteinase catalytic activity.** *Matrix Biol*. 2007;26:587-96.

RILEY, G. **The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective.** *Rheumatology*. 2004;43:131-42.

ROLF, C.; MOVIN, T. **Etiology, histopathology and outcome of surgery in achillodynia.** *Foot Ankle Int*. 1997;18:565-9.

RUTTER, J.L. *et al.* **A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription.** *Cancer Res*. 1998;58:5321-5.

SANTOS, M.C. *et al.* **Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure.** *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19:38-43.

SATOMI, E. *et al.* **Changes in histoanatomical distribution of types I, III and V collagen.** *Clinics*. 2008;63(1):9-14.

SHIMIZU, Y. *et al.* **A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and interleukin-8 gene promoter predicts poor prognosis in tongue cancer.** *Auris Nasus Larynx*. 2008;35:381-9.

SONG, Y.Q. *et al.* **Association between promoter -1607 polymorphism of MMP1 and lumbar disc disease in Southern Chinese.** *BMC Med Genet*. 2008;9:38.

SORSA, T.; TJÄDERHANE, L.; KONTTINEN, Y.T. **Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation.** *Ann Med*. 2006;38:306-21.

SOUZA, A.P. *et al.* **MMP1 promoter polymorphism: association with chronic periodontitis severity in a brazilian population.** *J Clin Periodontol.* 2003;30:154-8.

TASCI, A.I. *et al.* **A single-nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances bladder cancer susceptibility.** *BJU Int.* 2008 Feb;101(4):503-7.

THOMPSON, M.W. *et al.* **Thompson & Thompson: genetics in medicine.** 5th ed. Philadelphia: Saunders; 1991.

TREVILATTO, P.C.; LINE, S.R. **Use of buccal epithelial cells for pcr amplification of large DNA fragments.** *J Forensic Odontostomatol.* 2000;18:6-9.

VINCENTI, M.P. *et al.* **Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription and mRNA stability.** *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1996;6:391-411.

WANG, C.H. *et al.* **HPMMP-1(-1607G) polymorphism as a risk factor for fibrosis after pulmonary tuberculosis in Taiwan.** *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010;14(5):627-34.

WOO, M. *et al.* **Clinical implications of matrix metalloproteinase-1, -3, -7, -9, -12, and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in colorectal cancer.** *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22:1064-70.

YAMADA, Y. *et al.* **Association of a polymorphism of the matrix metalloproteinase-1 gene with bone mineral density.** *Matrix Biology.* 2002; 21: 389-392.

YE, S. **Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome.** *Cardiovasc Res.* 2006;69:636-45.

YE, S. **Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases.** *Matrix Biol.* 2000;19:623-39.

ZIOBER, B.L. *et al.* **Type I collagen degradation by invasive oral squamous cell carcinoma.** *Oral Oncol.* 2000;36:365.