

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

FRANCIELLE BOÇON DE ARAUJO MUNHOZ

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO NA MMP-13 (ISOLADO E EM
HAPLÓTIPO COM MMP-1 E MMP-8) E TENDINOPATIA PRIMÁRIA DO TIBIAL
POSTERIOR

CURITIBA
2014

FRANCIELLE BOÇON DE ARAUJO MUNHOZ

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO NA MMP-13 (ISOLADO E EM
HAPLÓTIPO COM MMP-1 E MMP-8) E TENDINOPATIA PRIMÁRIA DO TIBIAL
POSTERIOR

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau mestre em Biologia Celular e Molecular, no curso de Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina L. G. Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen de Souza

CURITIBA
2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Munhoz, Francielle Boçon de Araujo

Associação entre polimorfismo na MMP-13 (isolado e em haplótipo com MMP-1 e MMP-8) e tendinopatia primária do tibial posterior / Francielle Boçon de Araujo Munhoz. – Curitiba, 2011.
72 f. : il., tabs.

Orientadora: Maria Cristina L. G. Santos

Co-orientador: Ricardo Lehtonen de Souza

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular.

Inclui Bibliografia.

1. Polimorfismo (Genética). 2. Tendinopatia. I. Santos, Maria
Cristina Leme Godoy dos. II. Souza, Ricardo Lehtonen de. III. Título.
IV. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular.

CDD 616.39042


TERMO DE APROVAÇÃO


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR


Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Profa. Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná


Profa. Dra. Lupe Furtado Alle
Depto. Genética - UFPR


Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Depto. Biologia Celular - UFPR

Suplente:


Prof. Dr. Rubens Bertazzoli Filho
Depto. Biologia Celular - UFPR

Após arguir a mestranda **Francielle Boçon de Araujo Munhoz**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Associação entre polimorfismo na MMP-13 (isolado e em haplótipo com MMP-1 e MMP-8) e tendinopatia primária do tibial posterior", são de parecer favorável à ~~ACONATA~~..... da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 24 de Setembro de 2014



CENTRO POLITÉCNICO - CEP-81.531-990-JARDIM DAS AMÉRICAS-Caixa Postal 19031-
FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 - E-Mail: pgbiocel@ufpr.br - www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA-PR


Prof. Dr. Ciro A. Oliveira Ribeiro
Depto. Biologia Celular / UFPR
Mat. Saípe 03473961

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela minha vida, proteção, amor e por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho que me ajudam e me apóiam.

A minha professora e orientadora Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, pela boa vontade, apoio, incentivo, paciência e tempo despendido para a conclusão deste trabalho.

Ao meu Co-orientador Ricardo Lehtonen de Souza e sua equipe, pelo acolhimento, incentivo e disponibilização do laboratório para a realização deste trabalho.

Ao meu marido e filhos por fazer parte de minha vida e acreditar em meu potencial e sempre me apoiar na concretização dos meus sonhos.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Biologia Celular e Genética, pela colaboração, amizade e companheirismo.

“Os caminhos de Deus são desconhecidos e por vezes confusos para nós, porém, confia e espera, pois, ao fechar uma porta sempre abrirá uma janela e por ela a luz entrará e indicará o melhor caminho a seguir na jornada da vida...”

RESUMO

O tendão tibial posterior (TTP) é particularmente vulnerável e sua insuficiência é reconhecida como a principal causa do pé plano adquirido do adulto. Alguns pacientes têm uma predisposição sem causa clinicamente reconhecida, sugerindo que as características individuais, incluindo fatores genéticos, desempenham um papel importante na tendinopatia. As metaloproteinases da matriz (MMP) são enzimas responsáveis por degradar e remodelar o colágeno, principal componente dos tendões. O objetivo do presente estudo foi investigar a associação do polimorfismo -77 (rs2252070) da MMP-13 isoladamente e em haplótipo com os polimorfismos -519 (rs1144393) e -1607 (rs1799750) da MMP-1 e -799 (rs11225395) da MMP-8 e a predisposição a disfunção do TTP. A amostra de 200 pacientes selecionados foi dividida em: grupo teste com 100 pacientes submetidos à procedimentos cirúrgicos e de diagnóstico histopatológico de lesão degenerativa do tendão tibial posterior e grupo controle com 100 pacientes com tendão do tibial posterior intacto e sem sinais de degeneração. O DNA dos voluntários foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, por extração com acetato de amônio. A identificação dos genótipos foi realizada por PCR e RFLP. A análise estatística dos resultados foi realizada pelos testes de Mann-Whitney U (idade), Exato de Fisher (IMC), Regressão logística múltipla, Análise por combinação, Chi-quadrado (frequências alélicas e genotípicas) e SNPstats (haplótipos), todos com nível de significância de 5%. Houve uma diferença significativa nas frequências alélicas e genotípicas entre os grupos teste e controle para os polimorfismos -77 da MMP-13, -519 e -1607 da MMP-1 e -799 da MMP-8. Análise de haplótipo indicou diferença significativa entre os dois grupos estudados. De acordo com nossos resultados o polimorfismo -77 da MMP-13 isoladamente e em haplótipo com polimorfismos -519 e -1607 da MMP-1 e -799 da MMP-8 está associado à tendinopatia no tendão do tibial posterior.

Palavras-chave: MMPs, MMP-1, MMP-8, MMP-13, Metaloproteinases,
Polimorfismos em MMPs, Tendinopatia do Tibial Posterior.

ABSTRACT

Posterior tibial tendon (PTT) is particularly vulnerable and its insufficiency is recognized as the main cause of adult acquired flatfoot. Some patients have a predisposition without clinically recognized cause, suggesting that individual characteristics, including genetic factors, play an important role in tendinopathy. The matrix metalloproteinases (MMP) are enzymes responsible for degrading and remodeling the collagen, the main component of tendons. The objective of the present study is to investigate the association of -77 (rs2252070) matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) polymorphism and its haplotypes with -1607 (rs1799750), -519 (rs1144393) MMP-1 and -799 (rs11225395) MMP-8 and risk of PTT dysfunction. The sample of 200 selected patients was divided into test group: 100 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 Mann-Whitney U test (age), Fisher's Exact (IMC), multiple logistic regression, analysis by combining and Chi-squared (allelic and genotype frequency) and SNPstats (haplotype), test with significance level of 5%. There was a significant difference in the presence of the different alleles and genotypes between the control group and test group for the -77 MMP-13, -519 and -1607 MMP-1, -799 MMP-8, polymorphism. Global haplotype analysis indicated a significant difference between both groups. According to our results, -77 MMP-13 polymorphism and its haplotypes with -519, -1607 MMP-1 and -799 MMP-8 are associated to tendinopathy in posterior tibial tendon.

Keywords: MMPs, MMP-1, MMP-8, MMP-13, metalloproteinases, Polymorphisms in MMPs, Posterior Tibial Tendinopathy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	As setas indicam a inserção do Tendão Tibial Posterior, localizado na face medial do pé.....	15
FIGURA 2-	Paciente com Tendinopatia do Tibial Posterior, mostra as características clínicas no pé esquerdo.....	16
FIGURA 3-	Representação geral da estrutura de uma metaloproteinase da Matriz (MMPs), ilustra as semelhanças estruturais, variando apenas alguns domínios, que as diferenciam entre si.....	18
FIGURA 4-	Representação da localização dos genes da MMP-13, MMP-1 e MMP-8 no cromossomo 11.q22.3; b) Representação do gene da MMP-13 onde mostra o tamanho das sequências , seus éxons e íntrons; c) Representação do gene da MMP-1 onde mostra o tamanho das sequências , seus éxons e íntrons; d) Representação do gene da MMP-8 onde mostra o tamanho das sequências , seus éxons e íntrons.....	26
FIGURA 5-	Imagem feita durante a coleta do material da paciente, mostra a paciente após ter feito o bochecho com a solução de glicose 3% depositando o material no tubo de coleta.....	30
FIGURA 6-	Imagem da aplicação do produto de PCR e RFLP em gel de agarose, ao lado esquerdo imagem da cuba de eletroforese 10x10cm com gel de após a aplicação das amostras.....	33
FIGURA 7-	Análise das amostras através do software KODAK1D. As três imagens mostram o mesmo gel, e em cada quadro a análise individual de cada amostra (lista vertical em vermelho) em comparação com os valores do padrão (lista vertical em rosa), ao lado esquerdo de cada gel o software mostra o sinal de cada banda (em azul) em comparação com o sinal do ladder (em rosa).....	33
FIGURA 8-	Valores plotados em forma de tabela pelo software KODAK1D, mostra o tamanho das bandas de cada amostra encontradas	

	no gel e comparação com o padrão de bandas utilizado.....	34
FIGURA 9-	Gel de Agarose mostra as amostras amplificadas após padronização do protocolo de amplificação do produto de PCR. As amostras de 1 a 13 DNA são de diferentes voluntários, a amostra 14 é o Padrão de peso molecular.....	37
FIGURA 10-	Fragmentos das amostras que passaram por PCR-RFLP do polimorfismo -77 da MMP-13	
	a) Padrões de bandas em gel de agarose corados com Gel red, para os genótipos G/G, A/G e A/A.	
	b) Imagem do gel plotado e analisada através do programa KODAK 1D.....	38
FIGURA 11	Gel de agarose com padrões de bandas para os genótipos A/A, A/G e G/G do polimorfismo -519 da MMP-1.....	39
FIGURA 12	Gel de agarose com padrões de bandas para os genótipos 1G/1G, 2G/2G E 1G/2G do polimorfismo -1607 da MMP-1.....	40
FIGURA 13	Gel de agarose com padrões de bandas para os genótipos T/T C/C e T/C do polimorfismo -799 da MMP-8.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Condições da técnica de PCR e RFLP para os polimorfismos -799 da MMP-8; -1607 e -519 da MMP-1.....	34
TABELA 2-	Frequências alélicas e genotípicas de SNPs dos genes da MMP-1, MMP-8 e MMP-13 nos grupos teste e controle e valores de p e de OR resultantes das comparações entre os grupos.....	42
TABELA 3-	Resultados das frequências haplotípicas geradas por três diferentes programas estatísticos (PHASES, SNPstats, SHESIS), considerando SNPs nos genes MMP-8, MMP-1 e MMP-13.....	43
TABELA 4	Frequências haplotípicas considerando os SNPs -799 da MMP-8, -519 e 1607 da MMP-1, e -77 da MMP-13 nos grupos controle e teste e valores de p, OR e p (Bonferroni) resultante das comparações entre os grupos.....	44
TABELA 5	Desequilíbrio de ligação entre SNPs: -799 da MMP-8, -519 e -1607 da MMP-1 e -77 da MMP-13.....	45
TABELA 6	Regressão Logística Múltipla dos SNPs da MMP-8 (-799), MMP-1 (-519 e -1607) e MMP-13 (-77), para análise de dependente variável caso controle.....	45
TABELA 7	Análise por combinação, os alelos foram agrupados em homocigotos usuais e homocigotos + heterocigotos polimórficos, separados e contados manualmente de acordo com a quantidade de polimorfismos em amostra e cada grupo, independente do gene, levando em consideração apenas a quantidade de SNPs em cada amostra.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
MMPs.	Metaloproteinases
kDa.	unidade Kilo Dalton
PB	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
RFLP.	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento(s) de Restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
SNPs.	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 TENDINOPATIA PRIMÁRIA DO TENDÃO TIBIAL POSTERIOR	15
2.2 METALOPROTEINASES	17
2.3 COLAGENASES	20
2.3.1 MMP-13	20
2.3.2 OUTRAS COLAGENASES, MMP-1 E MMP-8	21
2.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS	23
3 OBJETIVO GERAL	28
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 OBTENÇÃO DO DNA	30
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA	31
4.3 PCR (Polimerase Chain Reaction)- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism)	31
4.4 ELETROFORESE	32
4.5 ANÁLISE EM HAPLÓTIPO	34
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	35
5 RESULTADOS	36
5.1 ANÁLISE DA AMOSTRA	36
5.2 ANÁLISE DOS SNPs	37
5.3 ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS	43
5.4 ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTIPLA E ANÁLISE POR COMBINAÇÃO	45
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
APÊNDICES	67
ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

O tendão tibial posterior está localizado na face medial do pé, 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 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 melhor entendimento desta condição, durante os últimos anos, resulta do aumento expressivo dos estudos focados nas ciências básicas e no conhecimento da fisiopatogenia desta síndrome clínica.

A literatura demonstra que diversos fatores podem estar associados com a tendinopatia, entretanto, alguns casos ocorrem sem causas clinicamente reconhecidas, sugerindo um papel etiológico importante de fatores intrínsecos do paciente, entre eles polimorfismos genéticos.

Investigações bioquímicas revelam que o tendão tibial posterior é caracteristicamente composto por fibras de colágenas (Gonçalves *et. al.*, 2002; Satomi *et. al.*, 2008).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são mediadores importantes na remodelação do colágeno e desempenham um papel fundamental no controle da destruição tecidual. Entre elas, as collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) são capazes de modificar uma grande quantidade de proteínas extracelulares e gerar degradação e remodelação de tecidos lesados. O estudo de polimorfismos genéticos funcionais em genes que expressam essas metaloproteinases pode ser importante para melhor compreensão do processo de degeneração tendinosa.

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

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

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TENDINOPATIA PRIMÁRIA DO TENDÃO TIBIAL POSTERIOR

Degenerações dos tendões são comuns e constituem problema frequente na prática médica. Alguns tendões são particularmente vulneráveis e usualmente apresentam alteração degenerativa primária, tais como: o patelar, o calcâneo, os do manguito rotador, o do bíceps do braço, o tibial posterior, os fibulares e os de Aquilles (Riley, 2004; Abate *et. al.*, 2009). O tendão tibial posterior (TTP) esta localizado na face medial do pé (Figura 1) é particularmente vulnerável à degeneração e sua insuficiência é reconhecida como a principal causa do pé plano adquirido do adulto.

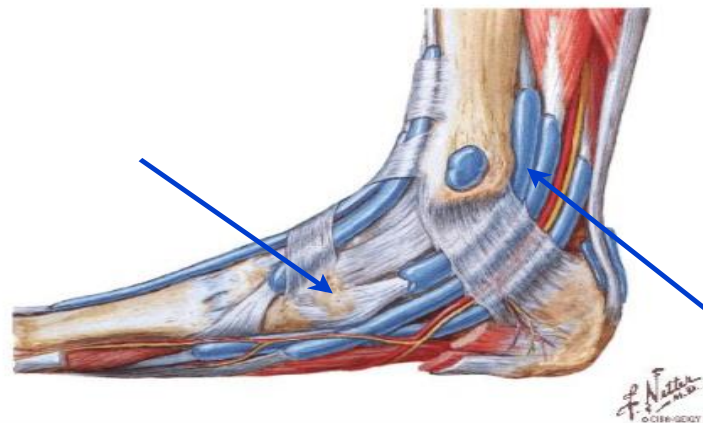


Figura 1- As setas indicam a inserção do Tendão Tibial Posterior, localizado na face medial do pé.

Fonte: RA Mann & M. J. Coughlin. 1993, Mosby, St Louis, ed 6, pp 757-784.

A insuficiência do tendão tibial posterior é três vezes mais frequente nas mulheres, especialmente em caucasianas, com sobrepeso e hipertensas, a média de idade para início dos sintomas é 40 anos, apresentando pico de incidência aos 55 anos (Deland *et. al.*, 2005). A Figura 2 mostra as características clínicas de paciente com tendinopatia primária no tibial posterior no pé esquerdo, onde é possível observar a perda do arco longitudinal medial do pé, deformidade em plano valgo e

edema da face medial do pé. Ainda há relato de dor, alteração do padrão normal da marcha e perda funcional.

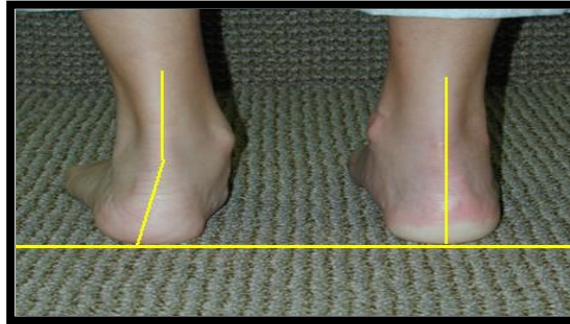


Figura 2- Paciente com Tendinopatia do Tibial Posterior, mostra as características clínicas no pé esquerdo.

Fonte: Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Diversos fatores etiológicos são propostos para explicar a síndrome: a presença do pé plano congênito (Kettelkamp, 1969; Dyal *et. al.*, 1987; Jahss, 1982; Mann, 1993; Johnson 1983, 1989; Funk *et. al.*, 1986), o impacto no túnel osteofibroso (Jahss, 1991), a presença do osso navicular acessório (Kidner, 1933), a região hipovascular do tendão (Frey *et. al.*, 1990, Holmes e Mann, 1993) e a demanda mecânica aumentada (Pomeroy *et. al.*, 1999). Entretanto, os conhecimentos dos fatores mecânicos, vasculares e neurológicos apresentam alcance limitado na explicação etiológica de muitos casos (Rolf, 1997; McLauchlan, 2001; Riley, 2004).

Collings e Raleigh (2009) revelam que características individuais podem predispor a lesões do aparelho locomotor, sugerindo que fatores intrínsecos do paciente desempenham papel etiológico importante. Assim, parece existir um grupo de indivíduos com predisposição genética para desenvolver doenças do tendão (Posthumus *et. al.*, 2009a; Collings; Raleigh, 2009).

Investigações bioquímicas revelam que o tendão tibial posterior é caracteristicamente composto por mais de 95% de fibras de colágeno tipo I e quantidades relativamente pequenas de outros tipos de colágeno, como: tipos III, IV e V (Gonçalves *et. al.*, 2002; Satomi *et. al.*, 2008).

Uma vez que o tendão tibial posterior é principalmente composto de fibras colágenas e alterações na sua proporção e/ou distorções da sua arquitetura levam a tendinopatia, torna-se importante avaliar a participação de enzimas relacionadas a remodelação e degradação dessas fibras.

2.2 METALOPROTEINASES

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são mediadores importantes na remodelação do colágeno e desempenham um papel fundamental no controle da destruição tecidual, de modo que podem estar relacionadas à patogênese das tendinopatias. Assim sendo, no intuito de contribuir para melhor elucidar a etiologia molecular desta importante patologia, torna-se imprescindível o estudo do controle de expressão dos genes relacionados a tais proteases.

As MMPs são um grupo de enzimas endopeptidases que têm capacidade de degradar praticamente toda a matriz extracelular, membrana basal e seus componentes (Birkedal-Hansen *et. al.*, 1993). Portanto, possuem papel importante na regulação da homeostase da matriz extracelular em humanos (Mott, 2004). Estas proteases são secretadas pelas células locais (Alberts *et.al.*, 2004), muitas de suas atividades biológicas são exercidas em ambiente extracelular, onde influencia criticamente o comportamento celular, variando os alvos de degradação ou de atividade proteolítica das moléculas da matriz extracelular, peptídeos de fator de crescimento, citosinas, moléculas de adesão celular e muitos outros tipos de receptores e glicoproteínas residentes na superfície celular (Sternlicht e Werb, 2001; Butler *et. al.*, 2009).

O grupo das MMPs em humanos é composto por 24 genes, com 23 tipos de MMPs, pois a MMP-23 é codificada por dois genes idênticos (Hadler-Olsen *et. al.*, 2011). Todos os tipos apresentam similaridades estruturais e funcionais. Os membros da família de MMPs foram identificados e tiveram seus nomes descritos originalmente baseados no conhecimento limitado da preferência por substrato específico (Sternlicht e Werb, 2001). O sistema de números sequenciais baseado na ordem de descobrimento foi adotado quando se tornou claro que existiam mais MMPs do que haviam previsto anteriormente (Woessner & Nagase, 2000).

Mesmo com nome sequencial numérico as MMPs continuam divididas em subgrupos baseados em seus substratos primários: collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MMPs de membrana e outras (Del Buono *et. al.*, 2012; Nagase *et. al.*, 1999).

A estrutura das metaloproteinases (Figura 3) deriva de um protótipo de três a cinco domínios e tem pelo menos, um pró-domínio com região C terminal rico em cisteína, que mantém a enzima como um zimógeno inativo até que seja removido por proteólise, domínio de articulação rico em Prolinas e um domínio Hemopexina/Vitronectina, que medeia à interação entre a enzima e as TIMPs e associação entre os receptores celulares. (Hadler-Oslen *et. al.*, 2011, Nagase, 2003).



Figura 3 – Representação geral da estrutura de uma metaloproteinase da Matriz (MMPs), ilustra as semelhanças estruturais, variando apenas alguns domínios, que as diferenciam entre si.

Fonte: Adaptado de Hannas, 2007b.

A maioria das MMPs são sintetizadas e secretadas na forma inativa (zimógenos); são convertidas para atividade proteolítica por meio de vários processos regulatórios (Huntley *et. al.*, 2012), que ocorrerem a nível transcricional, traducional e pós traducional (Sternlicht e Werb, 2001). Ainda podem ser reguladas por interação com inibidores proteolíticos, como a α 2-macroglobulina (proteína

plasmática que age como um inibidor de proteases) ou seus inibidores teciduais específicos (TIMPs) (Lenglet *et. al.*, 2013).

A ativação enzimática requer a remoção do domínio pró-peptídeo por meio da degradação por proteases e sua atividade pode ainda ser regulada por citocinas, hormônios, fatores de crescimento, estresse de cisalhamento ou estresse oxidativo (Spinale, 2007).

MMPs são amplamente distribuídas, mas sua estrutura é bastante conservada (McGeehan *et. al.*, 1992). Todas elas possuem uma sequência gênica com alta taxa de similaridade, sugerindo que foram duplicadas a partir de um gene ancestral comum. Dos genes das MMPs humanas, oito estão no cromossomo 11 (Shapiro, 1998). Outros genes que as sintetizam estão distribuídos entre os cromossomos 1, 8, 12, 14, 16, 20 e 22 (Shapiro, 1998).

As metaloproteinases desempenham papel relevante em vários processos de remodelação fisiológica, como no desenvolvimento embrionário, na involução uterina pós-parto, remodelação óssea, cicatrização de feridas (Woessner, 1991), na angiogênese (Newby, 2005), na reposição celular, remielinização e restabelecimento de conectividade e integridade neurovascular (Huntley *et. al.*, 2012).

Alterações nas atividades das MMPs são relatadas em diversos processos patológicos, como na inflamação por meio da migração leucocitária (Knauper *et. al.*, 1993), no crescimento e expansão de tumores benignos e metástases (Basset *et. al.*, 1997, Johnsen *et. al.*, 1998; Egeblad e Werb, 2002; Yang *et. al.*, 2013), nas neoplasias primárias (Zhou *et. al.*, 2010; Park *et. al.*, 2011; Wu *et. al.*, 2011), câncer colorretal (Shalaby *et. al.*, 2014; Saeed *et. al.*, 2013), câncer de próstata (Schweigert *et. al.*, 2013), câncer de mama (Saeed *et. al.*, 2013), câncer oral (Pereira *et. al.*, 2012), ainda em algumas patologias como: colite (Madisch *et. al.*, 2011), na reabsorção óssea (Okada *et. al.*, 1995), artrite reumatoide (Ye *et. al.*, 2007; Sun *et. al.*, 2013), osteoartrite (Barlas *et. al.*, 2009), na neuroinflamação, isquemia e hipóxia (Rivera *et. al.*, 2010), na desmielinização (Yong *et. al.*, 2005), no traumatismo cerebral e espinhal, lesão medular, e degeneração neuronal (Zhang *et. al.*, 2010), cardiomiopatia hipertrófica (Privalova *et. al.*, 2014), doença arterial coronariana (Wu *et. al.*, 2013), fibrilação atrial persistente (Lombardi *et. al.*, 2011), isquemia cerebral (Chehaib *et. al.*, 2014; Nie *et. al.*, 2014), formação de placas na carótida (Li *et. al.*, 2014; Zu *et. al.*, 2013), diabetes tipo 2 (Singh, 2013), doença de Parkinson e

esclerose lateral amiotrófica (He *et. al.* 2013), periodontite (Pan *et. al.*, 2013) entre outras.

2.3 COLAGENASES

As colagenases degradam todas as moléculas de colágeno, especialmente colágeno fibrilar e incluem MMP-1 ou colagenase-1, MMP-8 ou colagenase-2 e MMP-13 ou colagenase-3, as quais serão tratadas neste trabalho.

As colagenases tem em sua estrutura um pré-domínio, um pró- domínio (rico em cisteína), um domínio catalítico (contém íons de zinco no sítio ativo) e um domínio hemopexina (Hannas, 2007; Nagase *et. al.*, 2006).

2.3.1 MMP-13

As colagenases degradam colágenos fibrilares dos tipos I, II, III, V e XI. A MMP-13 adicionalmente degrada colágenos tipo IV, IX, X e XIV, a isoforma grande da tenascina C, a fibronectina, a laminina, agrecano, proteína do núcleo, fibrilina-1 e inibidores de serina-proteases (Mokone *et. al.*, 2006; Posthumus *et. al.*, 2009a). A MMP-13 também ativa pró-MMPs latentes. Sua ampla afinidade por diferentes substratos torna a MMP-13 uma das mais potentes metaloproteinases da degradação de matriz extracelular (Saracini *et. al.*, 2012).

As MMP-13 são enzimas com 60k Da na forma inativa e 48 kDa na forma ativa (Sternlicht e Werb, 2001; McQuibban *et. al.*, 2002). Os níveis de pró-formas e formas ativas de MMPs e sua atividade proteolítica nem sempre são inferidas pelos níveis de mRNA; estudos bioquímicos mostraram que MMP-13, entre outras, possuem níveis abaixo das condições basais em humanos adultos (Vecil *et. al.*, 2000; Jaworski, 2000). A MMP-13 tem uma distribuição de tecido limitada e um padrão altamente regulado de expressão. A expressão de MMP-13 ocorre na camada de revestimento sinovial, células endoteliais vasculares, monócitos, osteoblastos e células de cartilagem em tecidos sinoviais reumatoides (Iwamoto *et.*

al., 2011), e também em células percussoras dos osteoclastos, epitélio sulcular gengival, fibroblastos gengivais, macrófagos e células plasmáticas (Pirhan *et. al.*, 2009).

A expressão da MMP-13 foi primeiramente descoberta em câncer de mama (Pirhan *et. al.*, 2009). Sabe-se que polimorfismos genéticos localizados na região promotora dos genes das MMP e podem conduzir a alterações na expressão de proteínas, na sua estrutura, na sua função e pode ser associado a predisposições a várias doenças (Pirhan *et. al.*, 2009).

O aumento da expressão de MMP-13 em alguns tecidos está associado com o aumento à susceptibilidade ao câncer (Gao *et. al.*, 2014), a invasão e progressão de inúmeros tumores sólidos em humanos (Egeblad e Werb, 2002), em graves neoplasias invasivas, como: câncer de pulmão (Gao *et.al.*, 2014; Sanli *et. al.*, 2013), câncer de mama (Wieczorek *et. al.*, 2012; Saeed, 2013), câncer epitelial do ovário (Jia *et. al.*, 2010), câncer epitelial na cabeça, pescoço e vulva, no início e metástase de melanomas (Ala-aho, 2004). O aumento de expressão também está envolvido em outras doenças como na degeneração no tendão de Achilles, do manguito rotador (Mos, 2007; Lo, 2004, Jones, 2006), na artrite reumatóide (Ye, 2007), doença arterial coronariana (Vasku *et. al.*, 2012), doença da aorta abdominal (Saracini *et. al.*, 2012) e cárie dental (Tannure *et. al.*, 2012).

2.3.2 OUTRAS COLAGENASES, MMP-1 E MMP-8

A colagenase-1 ou MMP-1, apresenta um proeminente papel na degradação específica do colágeno tipo I, o maior componente da matriz extracelular e dos tendões. A metaloproteinase MMP-1 cliva o colágeno I que posteriormente é degradado por outras enzimas (De Souza e Line, 2002), e desnatura-se formando gelatina que é degradada pelas gelatinases (MMP-2 e MMP-9) (Cotrim *et. al.*, 2002; Stamenkovic, 2000).

A MMP-1 é uma enzima com 52 kDa na forma inativa e 41 kDa na forma ativa que é expressa *in vivo* em áreas de rápida remodelação tecidual fisiológica ou patológica (Westermarc e Kähäri, 1999). Ela é expressa em uma ampla variedade de células normais, como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos,

condrócitos, osteoblastos e osteoclastos e também em várias células tumorais (Brinckerhoff *et. al.*, 2000).

Os substratos já identificados desta enzima são os colágenos dos tipos I, II, III, V, VII, VIII, IX e X, além de agrecano e α 2-macroglobulina (Nabeshima *et. al.*, 2002; Westermarc & Kähäri, 1999). Lynch e Matrisian (2002) relatam que além destes substratos a MMP-1 ainda degrada o colágeno tipo XI, gelatina, entacina, fibronectina, laminina, tenascina e vitronectina.

Em condições fisiológicas normais, a MMP-1 é expressa em baixos níveis (Birkedal-Hanssen *et. al.*, 1993); no entanto, sua expressão pode aumentar significativamente em condições patológicas. Joseph e colaboradores (2009) descrevem o aumento da expressão associada com sinais histológicos de tendinopatia.

O aumento da expressão de MMP-1 é associado a vários tipos de neoplasias, como: câncer colo retal (Woo *et. al.*, 2007; Ji *et. al.*, 2013), câncer de bexiga (Tasci *et. al.*, 2008; Yan *et. al.*, 2014), carcinoma oral (Shimizu *et. al.*, 2008; Nishizawa *et. al.*, 2007), carcinoma de nasofaringe (Nasr *et. al.*, 2007) câncer na laringe (Olejniczak, 2012), câncer no pulmão (Xiao *et. al.*, 2012; Hu *et. al.*, 2013), câncer de mama (Wieczorek *et. al.*, 2012), tumor no estomago (Dey *et. al.*, 2014), câncer gástrico (Dedong *et. al.*, 2014), endometriose (Trovó, 2012), doença arterial coronariana e obstrutiva periférica (Horne *et. al.*, 2008; Flex *et. al.*, 2007), soltura precoce de prótese do quadril (Godoy-Santos *et. al.*, 2009), anomalias congênitas do rim e trato urinário em crianças (Djuric *et. al.*, 2014), pancreatite crônica (Sri *et. al.*, 2013), prolapso de órgão pélvicos (Skorupski *et. al.*, 2013), artrite reumatoide (Chen *et. al.*, 2012), degeneração no tendão do bíceps (Lakemeier, 2010), ruptura de cordas tendíneas na insuficiência mitral (Lin *et. al.*, 2013), periodontite crônica (Li *et. al.*, 2013), ainda, implica em diversas doenças pulmonares em relação à estrutura alveolar (Joos *et. al.*, 2000), asma (Wang *et. al.*, 2010), ruptura e destruição tecidual da cavidade pulmonar (Green *et. al.*, 2010; Kuo *et. al.*, 2008), fibrose pulmonar (Hsieh *et. al.*, 2013) e resposta de cicatrização anormal (Elkington *et. al.*, 2011).

A MMP-8, também chamada de collagenase-2, é uma enzima que pode ser secretada tanto na forma não glicosilada de 55 kDa, quanto na forma glicosilada 75 kDa; quando clivada apresenta o peso molecular de 55-65 kDa (Hannas, 2007). Como a maioria das MMPs, a MMP-8 deve ser ativada antes de exercer suas funções. Essa ativação pode ser mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS)

de neutrófilos ativados, ou por uma variedade de proteases como catepsina G, quimotripsina e diversas MMPs (MMP -3, -7, -10 e -14) (Lenglet *et. al.*, 2013).

A MMP-8 foi primeiramente descoberta como sendo um produto exclusivo de neutrófilos, mas, subsequentemente, mostrou ser expressa por uma variedade de outros tipos de células, como: as endoteliais, musculares lisas, macrófagos, polimorfonucleares, fibroblastos gengivais, queratinócitos, condrócitos e odontoblastos (Palosaari *et. al.*, 2000; Prikk *et. al.*, 2001; Wahlgren *et. al.*, 2001; Pirilä *et. al.*, 2003), bem como células de neoplasia bucal (Moilanen *et. al.*, 2002).

Potencialmente a MMP-8 degrada uma variedade de substratos, particularmente o colágeno tipo I, que é clivado com três vezes mais eficiência comparada a outras colagenases, pois a MMP-8 cliva a molécula de colágeno na posição Glu775-Ile776, de forma a gerar dois fragmentos que podem ser degradados por proteases não específicas (Lenglet *et. al.*, 2013).

MMP-8 é um importante mediador de destruição em diversas doenças inflamatórias e está relacionada a doenças cardiovasculares (Herman *et. al.*, 2001), arteriosclerose (Laxton *et. al.*, 2009), arterosclerose carótida (Djuric *et. al.*, 2011), vulnerabilidade à placa carótida (Wang *et. al.*, 2012), bronquiectasia (Sepper *et. al.*, 1995; Lee *et. al.*, 2007), asma (Shimoda *et. al.*, 2013), insuficiência pulmonar (Roderfeld *et. al.*, 2009), melanomas (Vihinen *et. al.*, 2008), neoplasias do sistema nervoso central (Köhrmann *et. al.*, 2009), câncer de mama (Wieczorek *et. al.*, 2012), câncer no ovário (Arechavaleta-Velasco *et. al.*, 2014), cicatrização em diabéticos (Kumar *et. al.*, 2006), falha de implantes osseointegrados dentários (Costa-Junior *et. al.*, 2013), periodontite generalizada agressiva (Emingil *et. al.*, 2014), entre outras.

2.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Polimorfismos são variações genéticas nas quais o alelo mais frequente tem frequência gênica menor a 99% (Thompson *et. al.*, 1991). Aproximadamente 90% dos genes polimórficos são de nucleotídeo único (*SNPs- Single Nucleotide Polymorphisms*), devido a uma troca ou inserção/deleção de uma única base (Ra e Parks, 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 genes, como os de metaloproteinases (Cargill *et. al.*, 1999). Os polimorfismos genéticos provavelmente influenciam a degeneração tendínea por meio do efeito acumulado de múltiplos polimorfismos, envolvendo interações complexas entre múltiplos genes (Adamo *et. al.*, 2001). Para entender a importância de cada alelo é necessário avaliar a contribuição de cada polimorfismo no fenótipo da doença (Magra, 2008).

Mokone *et. al.* (2005) demonstram que o polimorfismo no gene alfa 1 do colágeno tipo V (*COL5A1*) está associado com sintomas de patologias do tendão calcâneo, onde o alelo A2 parece exercer um papel protetor.

O mesmo grupo comprova também o papel da tenascina-C nesse processo (Mokone *et. al.*, 2006). A análise do polimorfismo no gene da tenascina-C caracterizado pela repetição de guanina-timina (GT) indica que os indivíduos com 12 e 14 repetições GT no gene tenascina-C apresentam um risco seis vezes maior de desenvolver lesões no tendão calcâneo.

Um polimorfismo na cadeia alfa 1 do colágeno tipo I (GT) está associado a rupturas do ligamento cruzado anterior (Posthumus *et. al.*, 2009a), mas não com lesões de tendão calcâneo (Posthumus *et. al.*, 2009b).

Collings e Raleigh (2009) relatam que o polimorfismo do gene *COL5A1* está associado às doenças crônicas do tendão calcâneo.

Posthumus e Collings (2010) notam a comparação dos genótipos em pacientes com patologia do tendão de calcâneo *versus* pacientes normais; o principal achado revela que indivíduos que apresentam o polimorfismo do gene que expressa o fator transformador de crescimento beta 1 (*TGF-β1*), variante rs1800469 e o fator 5 de diferenciação de crescimento (*GDF-5*) variante rs143383 apresentam o dobro de risco para desenvolver a lesão.

Em trabalho publicado em 2011, Malila e colaboradores mostraram que a ruptura do ligamento cruzado anterior, considerada a lesão mais grave da articulação entre esportistas, está associado ao polimorfismo da região promotora de MMP-3 (-1612 5A6A). Os autores sugerem que tal polimorfismo deve ser incluído como fator de risco um modelo multifatorial para compreender as etiologias e fatores de risco para ruptura do ligamento cruzado anterior.

Motta e colaboradores (2014) mostraram uma associação positiva entre um polimorfismo na beta-defensina (rs1800972) e aumento da susceptibilidade à doença do manguito rotador. Os autores afirmam que a presença do alelo G aumenta a expressão constitutiva, os beta-defensinas humanas 1 e 3, e desempenham um papel importante no estabelecimento do manguito rotador. Ainda, os autores mostram que paciente portador do alelo T do polimorfismo no gene do receptor de fatores de crescimento de fibroblastos (rs13317) tem um risco aumentado em 3 vezes de desenvolver doença do manguito rotador.

Nosso grupo em projeto prévio mostrou que os polimorfismos -1607 e -519 da MMP-1 (Godoy-Santos *et al.*, 2013; Baroneza *et al.*, 2014) e -799 da MMP-8 (Godoy-Santos *et al.*, 2014) estão associados com a tendinopatia primária do tendão tibial posterior, enquanto o polimorfismo -1612 da MMP-3 parece não influenciar a tendinopatia desse tendão (em publicação). Diante disso, julgamos interessante o estudo de outros polimorfismos analisando possíveis marcadores genéticos relacionados à tendinopatia. Uma vez que duas colagenases estudadas anteriormente foram associadas com a tendinopatia do tibial posterior acreditamos que a colagenase-3 (MMP-13) tem um papel importante nas tendinopatias. Um polimorfismo na posição -77 é caracterizado por uma troca de adenina por guanina. Esse polimorfismo está associado a uma alteração da atividade de transcrição: o alelo A tem aproximadamente duas vezes mais atividade de transcrição, do que o alelo G (Yoon *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2014).

Os genes das metaloproteinases MMP-13, MMP-1 e MMP-8 estão localizados no cromossomo 11q22.3, sendo que, a MMP-13 abrange aproximadamente 12,7 Kb é composto por dez exons e nove íntrons (Pirhan *et al.*, 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4322>), a MMP-1 abrange 8,326 Kb é composto por dez exons e nove introns (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4312>) e a MMP-8 abrange 13,16 Kb e possui 11 éxons e dez íntrons (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4317>) todos ilustradas na Figura 4.

Um haplótipo é uma combinação em alelos de loci sintênicos, que são transmitidos juntos. Muitas vezes não se detecta a influência de um único sítio polimórfico na patologia, entretanto, quando analisado o haplótipo de diferentes polimorfismos, alelos herdados em combinação podem influenciar significativamente a predisposição e/ou evolução de determinada patologia. Além disso, os haplótipos têm uma maior probabilidade, do que os polimorfismos individuais, em mostrar desequilíbrio de ligação útil com uma variante ocasional desconhecida, tendo, portanto, um poder estatístico mais significativo. As colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) são as MMPs mais importantes na remodelação do tendão e a análise em haplótipo parece importante para a compreensão da influência genética das colagenases na tendinopatia primária do tibial posterior.

O interesse do grupo é catalogar diferentes polimorfismos relacionados com a tendinopatia primária, visando à identificação de indivíduos susceptíveis. Isso é de um valor clínico inestimável, uma vez que, uma seleção mais criteriosa poderia ser realizada e, no futuro, estratégias de prevenção e terapêutica individualizada poderiam ser desenvolvidas, visando modular a expressão de mediadores inflamatórios e dessa maneira aumentar a taxa de sucesso dos procedimentos cirúrgicos.

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é investigar o papel do polimorfismo genético da MMP-13, separadamente e em combinação haplotípica com polimorfismos de outras colagenases na tendinopatia primária do tibial posterior, em um estudo caso-controle.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a influência do polimorfismo rs2252070 na região promotora do gene da MMP-13 (-77), na fisiopatogênia da insuficiência primária do tendão tibial posterior, e assim, defini-lo como possível marcador genético relacionado.

2. Investigar a combinação haplotípica e regressão múltipla de polimorfismos em diferentes colagenases: MMP-1 (-1607 e -519) (rs1799750 e rs1144393); MMP-8 (-799) (rs11225395) e MMP-13 (-77) (rs2252070) e o risco de tendinopatia primária no tibial posterior em mulheres.

4 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 (Anexo 1).

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).

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. Os voluntários assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (modelo Anexo 2). Nosso grupo utilizou um banco de amostras de DNA com todas as informações clínicas dos voluntários e ampliou o número de amostras para esse projeto.

Estes pacientes foram identificados segundo idade, sexo, índice de massa corporal (IMC), diagnóstico da doença, 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:** 100 mulheres com diagnóstico clínico e anatomopatológico de lesão degenerativa primária do tendão tibial posterior. **Grupo-Controle:** 100 mulheres assintomáticas e com tendão tibial posterior íntegro na ressonância magnética.

Os pacientes do grupo controle foram pareados segundo idade e índice de massa corporal (IMC) com o grupo teste.

Pacientes de ambos os grupos apresentaram boas condições sistêmicas e ausência dos seguintes critérios de não inclusão: doença reumatológica, imunológica, diabetes, doença hepática e renais, hipertensas, infecções ou lesão prévia ou atual na topografia do pé e tornozelo, obesidade superior ao grau I, sexo masculino.

O estudo do polimorfismo genético foi realizado na Universidade Federal do Paraná. O grupo de pesquisadores de processamento do material celular não teve conhecimento do grupo ao qual faz parte o voluntário (estudo cego).

4.1 OBTENÇÃO DE DNA

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, 2000; 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, ilustrado na Figura 5. Nesta solução, foi adicionado 1ml de solução TNE (10MM Tris pH 8, 150MM NaCl e 2mM EDTA) e 1ml de Etanol. O Material foi congelado a -20°C e transportado até a Universidade Federal do Paraná por empresa credenciada, conforme o Procedimento Operacional Padrão da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.



Figura 5- Imagem feita durante a coleta do material da paciente, mostra a paciente após ter feito o bochecho com a solução de glicose 3% depositando o material no tubo de coleta.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA foi realizada na Universidade Federal do Paraná conforme protocolo de Aidar e Line (2007). As amostras foram incubadas por 16 horas com 20ng/ml de proteinase K (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) a 56°C. Foram adicionados 500uL de solução de acetato de amônio 10mM com EDTA 1mM e vortexado por 5 segundos. Após centrifugação a 17000g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e foram adicionados 540uL de isopropanol para cada 900ul da solução contendo DNA. Após centrifugação, o sobrenadante foi submetido à lavagem com etanol a 70% e seco por 15 minutos a 37°C. Foi realizada suspensão do DNA em 100ul de tampão TE (Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8), EDTA a 1 mM) a temperatura ambiente por três horas. A concentração do DNA genômico de cada amostra foi quantificada com o auxílio de um quantificador de DNA Nanodrop (Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná) e sua pureza estimada pela razão OD 260/280 (Maniatis *et. al.*, 1989).

4.3 PCR (*Polimerase Chain Reaction*) - RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram utilizadas para amplificação dos fragmentos das regiões reguladoras dos genes estudados. Para o fragmento da MMP-13 a reação de PCR foi realizada no Termociclador (Marca: Eppendorf, Mastercycler Gradient) com volume final de 20ul, sendo: 1ul de solução contendo aproximadamente 100ng de DNA, 10ul de Go Taq Green Master Mix (marca Promega) e 1ul dos seguintes oligonucleotídeos iniciadores Sense 5'-GATACGTTCTTACAGAAGGC-3'; Antisense 5'-GACAAATCATCTTCATCACC-3' (marca Invitrogen) e quantidade suficiente de água ultra-pura. A mistura com todos os reagentes foi submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C, anelamento a 50°C e extensão a 72°C, 1 minuto em cada temperatura; e por fim 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos da MMP-13 amplificados foram submetidos à digestão por enzimas de restrição para gerar fragmentos menores, técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Utilizou-se a enzima BsrI (BseNI) 10U/ul (Thermo Scientific), a qual cliva o fragmento amplificado (445 pares de base) que apresente o alelo G, gerando 2 fragmentos menores de 197 e 248 pares de base. A digestão foi realizada com volume final de 10ul, sendo: 5ul produto de PCR, 1ul da enzima acrescido de 2ul de seu respectivo tampão, 2ul de água ultra pura e 10ul óleo mineral (para evitar evaporação) por 16 horas a 65°C em termociclador (marca: Techgene).

4.4 ELETROFORESE

As sequências amplificadas (PCR) e digeridas (RFLP) foram analisadas por eletroforese em géis horizontais de Agarose 5% em Tampão TBE (89 mM de Tris-Borato, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA). A preparação do gel de Agarose 5% foi feita com 0,6 gramas de Agarose (Marca: Pronadisa), 30 ml de TBE acrescida de 30 ml de água destilada, a mistura foi aquecida em micro-ondas em potencia alta por 1 minuto com pausas para misturar.

Para confirmação da amplificação (PCR) utilizou-se o volume total de 5ul da reação de PCR e 1,5ul do reagente Gel Red (Marca: Biotium). Para a análise da digestão (RFLP) utilizou-se 10ul da reação de RFLP e 1,5ul da mistura do reagente Gel Red (Marca: Biotium).

A mistura foi aplicada em géis horizontais de Agarose 5% em uma cuba de eletroforese horizontal (Marca Uniscience – 10x10 cm), e submetida a uma corrente elétrica de 100V; 120mA e 60W durante aproximadamente 30 minutos para confirmação de amplificação e de 50 minutos para a corrida da reação de RFLP, ilustrada na Figura 6. A visualização foi feita em transluminador e a imagem capturada utilizando software *Digi Doc*.

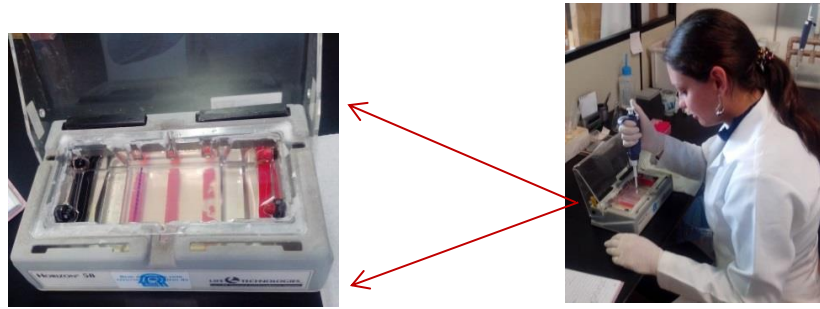


Figura 6 – Imagem da aplicação do produto de PCR e RFLP em gel de agarose, ao lado esquerdo imagem da cuba de eletroforese 10x10cm com gel de após a aplicação das amostras.

Estas imagens foram analisadas com ajuda do software KODAK1D Image Analysis Software que faz a análise das amostras plotadas, através da intensidade de sinal, amplitude da banda e compara com os valores do padrão de pares de base, cada amostra é analisada individualmente no mesmo gel (Figura 7) e gera uma tabela com valores de pares de base das bandas baseado nos valores da amostra padrão, ilustrado na Figura 8.

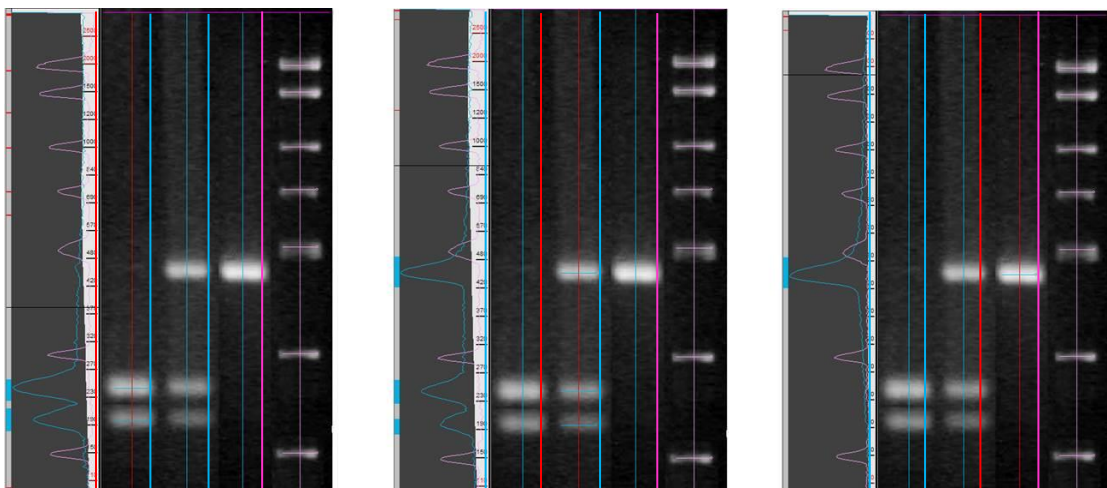


Figura 7. Análise das amostras através do software KODAK 1D. As três imagens mostram o mesmo gel, e em cada quadro a análise individual de cada amostra (lista vertical em vermelho) em comparação com os valores do padrão (lista vertical em rosa), ao lado esquerdo de cada gel o software mostra o sinal de cada banda (em azul) em comparação com o sinal do ladder (em rosa).

Lanes	1: 1	2: 2	3: 3	4: Francielle
Display	Mw (bp)	Mw (bp)	Mw (bp)	Mw (bp)
1	247,1	454,1	452,3	2000
2	198,5	248,5		1500
3		198,5		1000
4				750
5				500
6				300
7				150

Figura 8. Valores plotados em forma de tabela pelo software KODAK1D, mostra o tamanho das bandas de cada amostra encontradas no gel e comparação com o padrão de bandas utilizado.

4.5 ANÁLISE EM HAPLÓTIPO

Para a análise do haplótipo da MMP-1 (-1607 e -519), MMP-8 (-799) e MMP-13 (-77), foi necessário aumentar a análise das amostras da MMP-1 e MMP-8 realizada em estudo anterior para o pareamento dos voluntários. Para tanto foi realizada reação de PCR-RFLP de maneira semelhante ao descrito anteriormente. Os oligonucleotídeos iniciadores, a temperatura e o tempo de anelamento (amplificação), as enzimas de restrição, além do tamanho dos fragmentos gerados em pares de base (pb) estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1-Condições da técnica de PCR e RFLP para os polimorfismos -799 da MMP-8; -1607 e -519 da MMP-1.

Fonte: Godoy-Santos *et. al.*, 2013; Baroneza *et. al.*, 2014.

SNP	oligonucleotídeos iniciadores(5' - 3')	Anelamento	RFLP	pbPCR RFLP	Referencias
MMP-1 (-1607)	F*: TCGTGAGAATGTCTCCATT R**: TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC	55°C 30 s	Xmnl 37°C	118 89 + 29	Godoy-Santos <i>et. al.</i> , 2013
MMP-1 (-519)	F*: CATGGTGCTATCGCAATAGGGT R**: TGCTACAGGTTTCTCCACACAC	45°C 1 m	Kpnl 37°C	200 176+ 24	Baroneza <i>et al.</i> , 2014
MMP-8 (-799)	F*: CAGAGACTCAAGTGGGA R**:TTTCATTTGTGGAGGGGC	51°C 1 m	Bfml 37°C	106 74 + 32	Godoy-Santos <i>et. al.</i> , 2014

*Primer Foward, ** Primer Reverse.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

O Teste U de Mann Whitney foi utilizado para verificar diferença entre a idade e o Teste Exato de Fisher para verificar o índice de massa corpórea entre os dois grupos.

A associação entre os polimorfismos genéticos estudados e a tendinopatia primária do tendão tibial posterior foi avaliada pelo teste Qui-Quadrado, ao nível de significância de 5%, pelo programa BioEstat versão 5.0.

A análise estatística da estimativa de haplótipos, desequilíbrio de ligação e equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada utilizando os softwares SNPstats de livre acesso no endereço eletrônico: <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>, PHASES <http://www.bioinf.man.ac.uk/phase/> e SHEsis <http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>.

A análise de regressão logística múltipla, foi realizado utilizando o software Statistica for Windows versão 10.

A análise por combinação foi realizada através de contagem simples manual dos polimorfismos e avaliado utilizando Qui-quadrado ao nível de significância 5%, pelo programa Clump (Sham, 1995).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA AMOSTRA

Respeitados os critérios de inclusão e não inclusão, a amostra foi obtida por conveniência e composta por 200 mulheres, sendo: 100 no grupo-teste submetidas a procedimento cirúrgico e com diagnóstico clínico e anatomopatológico de lesão degenerativa primária do tendão tibial posterior e 100 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/ou pé.

Quanto ao estágio da Insuficiência do Tendão Tibial Posterior, o grupo-teste apresenta 52 pacientes no estágio II (tendinopatia/ deformidade pé plano flexível) e 48 pacientes no estágio III (tendinopatia/ deformidade pé plano rígido), conforme Sistema de Classificação descrito por Johnson e Strom (1989) (Anexo 3).

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 significativa ($p=0,086$) entre os dois grupos estudados, sendo a média de idade do grupo controle de 51,7 anos (variação de 47 a 56 anos) e do grupo teste de 54 anos (variação de 48 a 56 anos).

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 sobrepeso (de 25,0 a 29,9) - de acordo com a Organização Mundial de Saúde, obtido no endereço eletrônico de livre acesso: <http://www.abeso.org.br/imc/calcul-seu-imc.shtml>.

Considerados como variável independente, categórica e com distribuição não normal, foram analisados através do teste Exato de Fisher, que não identificou diferença estatística ($p=0,70$) entre os dois grupos estudados. No grupo controle 61 voluntários apresentaram índice de massa corpórea normal e 39 com sobrepeso e no grupo teste 65 indivíduos com índice normal e 35 com sobrepeso.

Em relação ao questionamento sobre a presença de pé plano desde a maturidade esquelética – fim da adolescência – a resposta foi positiva em 31% dos indivíduos do grupo teste e em 34,5% dos indivíduos do grupo controle.

5.2 ANÁLISE DOS SNPs

Os genótipos referentes a cada polimorfismo estudado estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Esse estudo visou amplificar um fragmento de 445 pares de base no gene da MMP-13 que engloba o polimorfismo na posição –77 o qual é caracterizado pela substituição de uma base adenina (A) por uma base guanina (G), criando dois alelos diferentes (A ou G). Os resultados demonstram que o método de extração de DNA utilizado foi adequado para obtenção de quantidades suficientes de DNA. A amplificação por PCR do fragmento teve suas condições otimizadas e mostrou-se eficiente (Figura 9).

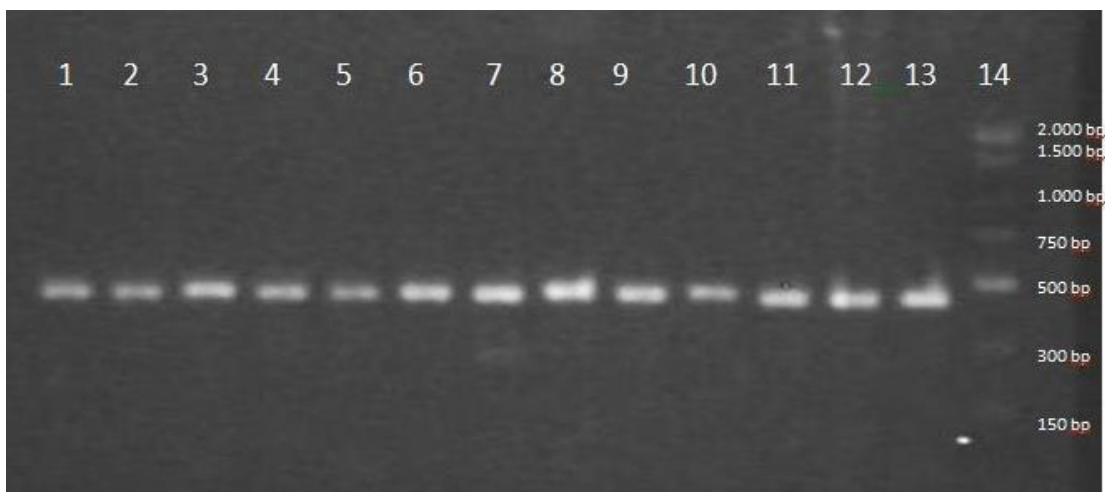


Figura 9- Gel de Agarose mostra as amostras amplificadas após padronização do protocolo de amplificação do produto de PCR. As amostras de 1 a 13 DNA são de diferentes voluntários, a amostra 14 é o Padrão de peso molecular.

A enzima de restrição *BsrI* reconhece o alelo G do sítio polimórfico -77 da MMP-13, e na presença deste o produto de PCR (445 pares de bases) é digerido em duas partes (248 e 197 pares de bases). Desta maneira na eletroforese, o alelo A foi representado por uma banda de DNA de 445 pares de bases, o alelo G foi representado pelas bandas de DNA de 248 e 197 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (bandas de 445, 248 e 197 pares de bases). A Figura 10 mostra os fragmentos amplificados e digeridos da MMP-13 (-77), caracterizando os diferentes genótipos e os padrões de banda plotado no software KODAK1D.

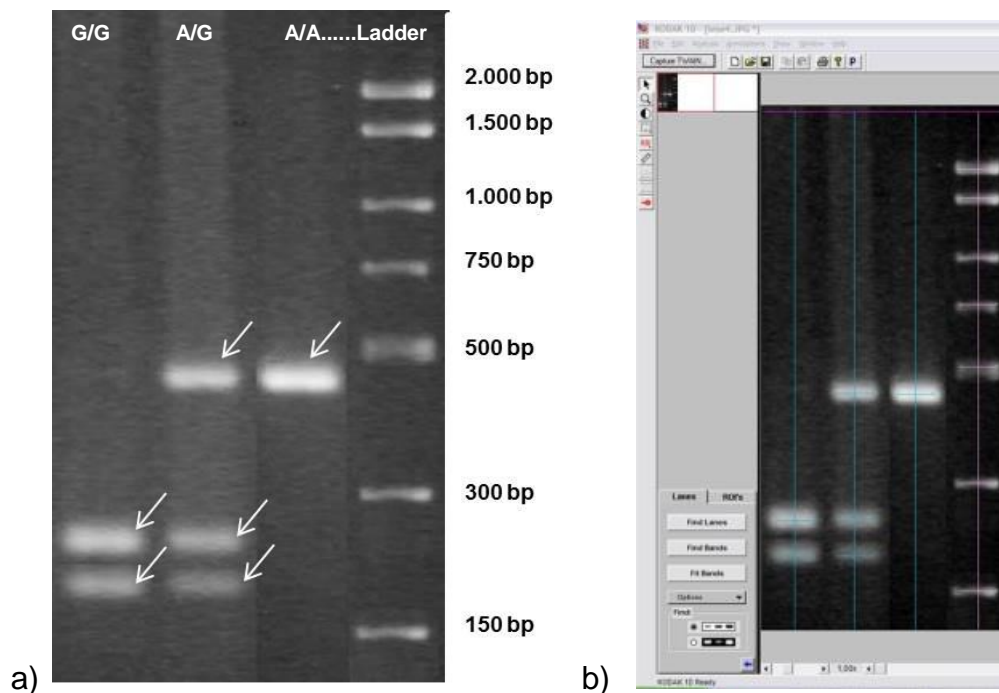


Figura 10- Fragmentos das amostras que passaram por PCR-RFLP do polimorfismo -77 da MMP-13
a) Padrões de bandas em gel de agarose corados com Gel red, para os genótipos G/G, A/G e A/A;
b) Imagem do gel plotado e analisada através do programa KODAK 1D.

Observou-se uma diferença estatisticamente significativa na frequência dos alelos e genótipos do polimorfismo -77 do gene da MMP-13 entre o grupo controle e grupo teste ($p=0,001$). O alelo A foi o mais freqüente, sendo encontrado em 76% do grupo teste e 61% do grupo controle. O genótipo homozigoto A/A foi encontrado em 57% do grupo teste, enquanto no grupo controle esse mesmo genótipo estava

presente em 32% dos pacientes. As freqüências alélicas e genótípicas do gene da MMP-13 estão mostradas na Tabela 2.

A análise dos 200 voluntários para os polimorfismos -519 e -1607 da MMP-1, foi proveniente de 150 amostras de trabalhos anteriores e de 50 amostras referentes a este projeto.

O polimorfismo na posição -519 da MMP-1 é caracterizado pela substituição de uma base de adenina (A) por uma base guanina (G) resulta em dois alelos: A e G. A enzima de restrição *KpnI* reconhece o alelo A e na presença deste o produto de PCR (200 pares de bases) é digerido em duas partes (176 e 24 pares de bases). Na eletroforese, o alelo G foi representado por uma banda de DNA de 200 pares de bases, o alelo A por uma banda de DNA de 176 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (200 e 176 pares de bases). Durante a eletroforese, a banda com 24 pares de bases saía do gel. A Figura 11 mostra os fragmentos amplificados e digeridos da MMP-1 (-519), caracterizando os diferentes genótipos.

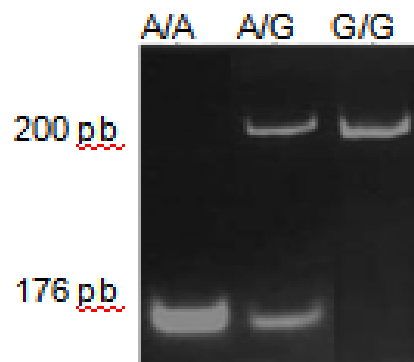


Figura 11- Gel de agarose com padrões de bandas para os genótipos A/A, A/G e G/G do polimorfismo -519 da MMP-1.

Na Tabela 2 pode-se observar que houve uma diferença na presença dos diferentes alelos e genótipos entre os grupos controle e teste, confirmando dados de estudo anterior (Baroneza *et. al.*, 2014). O alelo G foi encontrado em 63% do grupo teste, enquanto que em 56% dos pacientes do grupo de controle foi observado o

alelo A ($p < 0,001$). O genótipo mais frequente no grupo de teste foi G/G (44%) e no controle A/G (48%).

O polimorfismo na posição -1607 da MMP-1 é caracterizado pela inserção de uma base guanina (G), criando dois alelos diferentes (1G ou 2G). 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 12 mostra os fragmentos amplificados e digeridos da MMP-1 (-1607), caracterizando os diferentes genótipos.

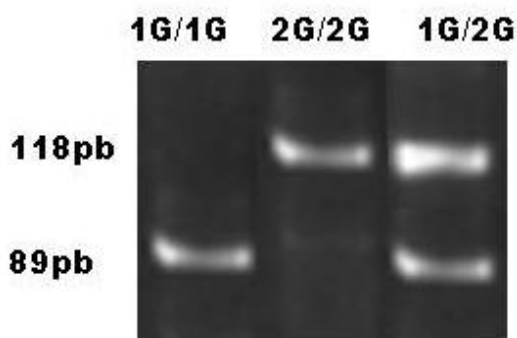


Figura 12- Gel de agarose com padrões de bandas para os genótipos 1G/1G, 2G/2G E 1G/2G do polimorfismo -1607 da MMP-1.

A análise do polimorfismo -1607 da MMP-1 indica diferença estatística significativa entre os grupos estudados, confirmando dados do estudo anterior (Godoy-Santos *et. al.*, 2013). Enquanto no grupo controle 75% dos voluntários apresentaram alelo 1G, esse mesmo alelo apareceu em apenas 22% dos pacientes do grupo teste. O genótipo 1G/1G foi o mais frequente no grupo controle (62%), enquanto o genótipo 2G/2G foi o mais frequente no grupo teste (68%). A frequência alélica e genotípica do gene da MMP-1(-1607) esta mostrada na Tabela 2.

O polimorfismo na posição -799 da MMP-8 é caracterizado pela substituição de uma base de citosina (C) por uma base (T) resulta em dois alelos: C e T. A enzima de restrição *Bfml* reconhece o alelo C e na presença deste o produto de PCR (106 pares de bases) é digerido em duas partes (74 e 32 pares de bases). Na eletroforese, o alelo T foi representado por uma banda de DNA de 106 pares de bases e o alelo C por uma banda de DNA de 74 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (106 e 74 pares de bases). A Figura 13 mostra os fragmentos de 106 e 74 pb amplificados e digeridos da MMP-8 (-799), o fragmento de 32 pb saia do gel, caracterizando os diferentes genótipos.

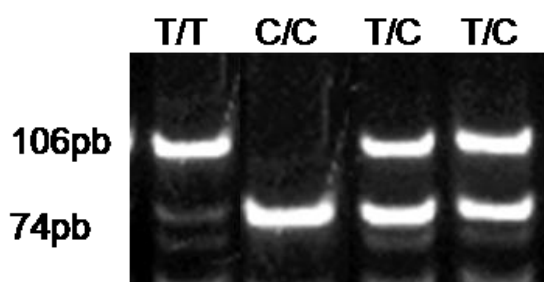


Figura 13- Gel de agarose com padrões de bandas para os genótipos T/T C/C e T/C do polimorfismo -799 da MMP-8.

Nesse estudo foi encontrada diferença estatisticamente significativa na frequência dos alelos e dos genótipos entre os grupos teste e controle, confirmando resultado de estudo anterior (Godoy-Santos *et. al.*, 2014). O alelo C foi encontrado em 72% do grupo controle, enquanto em 56% dos pacientes do grupo de teste foi observado o alelo A ($p < 0,001$). O genótipo o C/C foi encontrado com frequência de 67% no grupo controle e 37% no grupo teste. A frequência dos diferentes alelos e genótipos desse polimorfismo pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2- Frequências alélicas e genotípicas de SNPs dos genes da MMP-1, MMP-8 e MMP-13 nos grupos teste e controle e valores de p e de OR resultantes das comparações entre os grupos.

Gene	SNPs	Grupo Controle	Grupo Teste	Valor de p	OR * (95%CI)
MMP-1	-519 Alelo	n = 200	n = 200	<i>(Chi-squared)</i>	
	A	56 (112)	37 (74)	p < 0.001	2,17 (1,45-3,23)
	G	44 (88)	63 (126)		
	-519 Genotipo	n = 100	n = 100		
	A/A	32 (32)	18 (18)	p < 0.001	3,14 (1,68-5,90)
	A/G	48 (48)	38 (38)		
	G/G	20 (20)	44 (44)		
	-1607 Alelo	n = 200	n = 200		
	1G	75 (150)	22 (44)	p < 0.001	10,64 (6,69-16,90)
	2G	25 (50)	78 (156)		
	-1607 Genotipo	n = 100	n = 100		
	1G/1G	62 (62)	12 (12)	p < 0.001	15,58 (7,42-32,50)
1G/2G	26 (26)	20 (20)			
2G/2G	12 (12)	68 (68)			
MMP-8	-799 Alelo	n = 200	n = 200		
	C	72 (144)	44 (88)	p < 0.001	3,27 (2,16-4,96)
	T	28 (56)	56 (112)		
	-799 Genotipo	n = 100	n = 100		
	C/C	67 (67)	37 (37)	p < 0.001	3,46(1,93-6,19)
	C/T	10 (10)	14 (14)		
T/T	23 (23)	49 (49)			
MMP-13	-77 Alelo	n = 200	n = 200		
	A	61(122)	76 (152)	p = 0.001	2,02 (1,32-3,12)
	G	39 (78)	24 (48)		
	-77 Genótipo	n = 100	n = 100		
	A/A	32 (32)	57 (57)	p = 0.001	2,82 (1,58-5,02)
	A/G	58 (58)	38 (38)		
G/G	10 (10)	05 (05)			

* Os valores são expressos em porcentagem, com o número de sujeitos (n) entre parênteses.

5.3 ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS

Os polimorfismos utilizados para a inferência dos haplótipos foram ordenados segundo a disposição desses no cromossomo: MMP-8, MMP-1 e MMP-13, respectivamente.

Ambos os grupos apresentaram 14 haplótipos em comum e o grupo controle apresentou 2 haplótipos diferentes, totalizando 16 haplótipos encontrados nesse estudo. Observou-se ainda que o haplótipo mais frequente no grupo controle foi o C-A-1G-A e no teste foi T-G-2G-A. A Tabela 3 representa os haplótipos e suas frequências para os dois grupos estudados em diferentes programas estatísticos (SNPstats, PHASE version 2.1, SHEsis online software), mostrando resultados semelhantes nos três programas utilizados. Desse modo, as demais tabelas serão apresentadas com dados gerados a partir do programa SNPstat. Os resultados dos programas SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>) e PHASES (<http://www.bioinf.man.ac.uk/phase/>) estão nos Apêndices 1 e 2.

Tabela 3 – Resultados das frequências haplotípicas geradas por três diferentes programas estatísticos (PHASES, SNPstats, SHESIS), considerando SNPs nos genes MMP-8, MMP-1 e MMP-13.

	Haplótipos	Controle	Controle	Controle	Teste	Teste	Teste
		SNPstat	Phase	SHESIS	SNPstat	Phase	SHESIS
1	T-G-2G-A	0,015	0,015	0,016	0,296	0,296	0,297
2	C-G-2G-A	0,063	0,062	0,064	0,176	0,177	0,176
3	C-A-1G-A	0,191	0,191	0,191	0,017	0,016	0,017
4	C-A-1G-G	0,112	0,111	0,112	0,044	0,043	0,045
5	C-G-1G-A	0,156	0,158	0,157	0	0	0
6	T-A-2G-A	0,016	0,017	0,016	0,135	0,135	0,135
7	T-A-1G-G	0,105	0,104	0,105	0,035	0,035	0,035
8	C-A-2G-A	0,071	0,071	0,071	0,076	0,077	0,077
9	C-G-1G-G	0,065	0,064	0,065	0,064	0,064	0,065
10	T-G-1G-A	0,064	0,063	0,065	0,031	0,032	0,032
11	C-G-2G-G	0,038	0,038	0,038	0,037	0,036	0,037
12	T-A-1G-A	0,030	0,031	0,030	0,026	0,026	0,026
13	C-A-2G-G	0,021	0,021	0,021	0,022	0,022	0,023
14	T-G-2G-G	0,012	0,012	0,012	0,023	0,022	0,024
15	T-G-G-G	0,023	0,022	0,024	0	0	0
16	T-A-2G-G	0,012	0,012	0,012	0,011	0,012	0,011

As frequências dos haplótipos T-G-2G-A, C-G-2G-A, C-A-1G-A, C-A-1G-G, C-G-1G-A, T-A-2G-A e T-A-1G-G apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados ($p \leq 0,02$) considerando a correção de Bom Ferroni. O haplótipo T-G-2G-A representa risco e o haplótipo C-A-1G-A proteção à tendinopatia do tibial posterior. Análise de haplótipos global indicou uma diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,0001$). As frequências de cada haplótipo, o valor de p e OR (95% CI) podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4-Frequências haplotípicas considerando os SNPs -799 da MMP-8, -519 e 1607 da MMP-1, e -77 da MMP-13 nos grupos controle e teste e valores de p, OR e p (Bonferroni) resultante das comparações entre os grupos.

Haplótipos	Frequência Total	Frequência Controle	Frequência Teste	p-value	OR * (95%CI)	Correção de Bonferroni
1 T-G-2G-A	0,162	0,015	0,296	0,001	0,71 (0,62-0,81)	p < 0,003
2 C-G-2G-A	0,122	0,063	0,176	0,040	0,87 (0,77-0,99)	
3 C-A-1G-A	0,105	0,191	0,017	0,002	1,21 (1,07-1,38)	p < 0,003
4 C-A-1G-G	0,078	0,112	0,044	0,025	1,07 (0,94-1,22)	
5 C-G-1G-A	0,076	0,156	0	0,008	1,18 (1,04-1,34)	
6 T-A-2G-A	0,076	0,016	0,135	0,037	0,87 (0,77-0,99)	
7 T-A-1G-G	0,073	0,105	0,035	0,044	1,07 (0,95-1,22)	
8 C-A-2G-A	0,071	0,071	0,076	0,089		
9 C-G-1G-G	0,068	0,065	0,064	0,099		
10 T-G-1G-A	0,045	0,064	0,031	0,052		
11 C-G-2G-G	0,033	0,038	0,037	0,280		
12 T-A-1G-A	0,026	0,030	0,026	0,120		
13 C-A-2G-G	0,025	0,021	0,022	0,300		
14 T-G-2G-G	0,014	0,012	0,023	0,210		
15 T-G-G-G	0,012	0,023	0	0,110		
16 T-A-2G-G	0,009	0,012	0,011	0,370		

Os resultados dos testes de desequilíbrio de ligação entre os SNPs estudados encontram-se representados na tabela 5. O polimorfismo -77 da MMP-13 não está em desequilíbrio de ligação com os demais SNPs estudados.

Tabela 5- Desequilíbrio de ligação entre SNPs: -799 da MMP-8, -519 e -1607 da MMP-1 e -77 da MMP-13.

SNPs	MMP-8 (-779)	MMP-1 (-519)	MMP-1 (-1607)	MMP-13 (-77)
MMP-8 (-779)	X	D' = 0,0666	D' = 0,2322	D' = 0,0323
MMP-1 (-519)	p = 0,29	X	D' = 0,2335	D' = 0,0652
MMP-1 (-1607)	p = 1e04	p = 0,02	X	D' = 0,0437
MMP-13 (-77)	p = 0,60	p = 0,40	p = 0,56	X

Valores significativos de p e D' em cinza

5.4 ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTIPLA E ANÁLISE POR COMBINAÇÃO

Os resultados da análise dependente (Caso-Controle) de Regressão Logística Múltipla (tabela 6), demonstraram que os SNPs 1 (-799 da MMP-8), 2 (-519 da MMP-1), 3 (-1607 da MMP-1) e 4 (-77 da MMP-13) são fatores independentes de risco, sendo (SNP-1 $0,203 \pm 0,059$ e p- 0,000; SNP-2 $0,134 \pm 0,067$ e p- 0,047; SNP-3 $0,464 \pm 0,062$ e p- 0,000; SNP-4 $-0,141 \pm 0,059$ e p- 0,018) respectivamente.

Tabela 6 - Regressão Logística Multipla dos SNPs da MMP-8 (-799), MMP-1 (-519 e -1607) e MMP-13 (-77), para análise de dependente variável caso controle.

N=200	Regression Summary for Dependent Variable: Caso_Controle (Spreadsheet1) R= ,58956994 R ² = ,34759271 Adjusted R ² = ,33421000 F(4,195)=25,973 p<,00000 Std. Error of estimate: ,40900					
	b *	Std. Err. of b *	b	Std. Err. of b	T(195)	p- value
Intersept			0,087	0,083	1,050	0,294
SNP-1 MMP-8 (-799)	0,203	0,058	0,203	0,059	3,455	0,000
SNP-2 MMP-1 (-519)	0,116	0,058	0,134	0,067	1,993	0,047
SNP-3 MMP-1 (- 1607)	0,448	0,060	0,464	0,062	7,475	0,000
SNP-4 MMP-13 (-77)	-0,140	0,059	-0,141	0,059	-2,372	0,018

Os resultados da análise por combinação dos SNPs estão descritas na tabela 7, as amostras foram separadas em grupo teste e controle, levando em

consideração apenas a quantidade de SNPs por amostra, os resultados apresentaram diferença estatística, sendo $p < 0,0001$ e Qui quadrado= 31,89 DF1.

Tabela 7 – Análise por combinação, os alelos foram agrupados em homozigotos usuais e homozigotos + heterozigotos polimórficos, separados e contados manualmente de acordo com a quantidade de polimorfismos em amostra e cada grupo, independente do gene, levando em consideração apenas a quantidade de SNPs em cada amostra.

Quantidade SNPs	Frequência grupo Controle (n=100)	Frequência grupo Teste (n=100)	(Qui- squared)	p- value
0	6	0	31,89 DF=1	<0,0001
1	26	2		
2	30	33		
3	31	52		
4	7	13		

6 DISCUSSÃO

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

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 tiveram suas condições otimizadas e a escolha da enzima de restrição para a técnica de RFLP foi adequada para a análise dos polimorfismos estudados.

Assim, com metodologia reprodutível, de baixo custo e pouco invasiva, foi possível identificar marcadores moleculares para pacientes com tendinopatia primária do tendão tibial posterior.

O presente estudo utilizou um banco de DNA de 200 indivíduos, sendo 100 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.

Nosso interesse é catalogar diferentes polimorfismos relacionados à tendinopatia primária, uma vez que o perfil genético permite definir um grupo de marcadores genéticos para suscetibilidade a tendinopatia primária do tendão tibial posterior. Esse banco de 200 pacientes permitirá futuros estudos de outros sítios polimórficos nessa população e dessa forma ampliar o conhecimento da influência de SNPs na tendinopatia do tibial posterior.

Nesse estudo demonstrou-se que o polimorfismo na posição -77 da MMP-13 está associado à tendinopatia no tendão tibial posterior na população estudada. O alelo A foi observado na maior parte do grupo de teste, este alelo leva uma maior atividade da MMP-13 (o que pode indicar uma aumentada degradação do colágeno nas lesões no tibial posterior, tornando-o um alelo de risco a tendinopatia).

Em estudos prévios, nosso grupo observou que o polimorfismo -519 e -1607 da MMP-1 e -799 da MMP-8 estão associados à tendinopatia tibial posterior. Nesse estudo nós ampliamos a amostra dos estudos anteriores e confirmamos os resultados obtidos.

No polimorfismo -799 da MMP-8, o grupo teste apresentou frequência maior dos alelos T, o qual demonstra uma menor atividade de transcrição (Wang, 2004), sugerindo que esses pacientes teriam uma menor remodelação de colágeno pela MMP-8.

Analisando os SNPs da MMP-1 na posição -519 o alelo G foi o mais frequente no grupo teste. Apesar de esse polimorfismo estar associado a diversas patologias, até o momento, a literatura não correlaciona a atividade de transcrição entre os alelos desse SNP. Em relação ao polimorfismo -1607 da MMP-1, o alelo 2G apareceu com maior frequência no grupo teste. Uma vez que esse alelo aumenta a atividade de transcrição do gene, sugere-se que pacientes com alelo 2G apresentem uma degradação mais intensa de colágeno tendão tibial posterior, tornando esse um alelo de risco a tendinopatia.

Com o pareamento de 200 voluntários genotipados para quatro SNPs de diferentes colagenases, foi possível analisar a influência desses SNPs em combinação haplotípica. Na degeneração tendínea, como em qualquer processo multifatorial (Michalowicz *et. al.*, 2000), a combinação de vários polimorfismos de risco significativo agem sinergicamente para elevar a suscetibilidade e a alteração fisiológica. Alguns sítios polimórficos podem ser herdados em combinação, são os chamados haplótipos, os quais fornecem informações mais completas da influência dos polimorfismos no genótipo do processo.

Nesse sentido, a análise das frequências de haplótipos entre os polimorfismos de metaloproteases localizadas no mesmo cromossomo parecem ser de grande valor para compreensão da tendinopatia e dos mecanismos de compensação funcional do indivíduo.

Nesse estudo os resultados sugerem que os haplótipos podem representar um fator de risco para tendinopatia do tibial posterior. Os haplotipos C-A-1G-A e C-A-1G-G, C-G-1G-A e T-A-1G-G representaram proteção a tendinopatia do tibial posterior, enquanto os haplotipos T-G-2G-A, C-G-2G-A, T-A-2G-A representaram risco a tendinopatia. Os dados sugerem que os quatro polimorfismos estudados tem

um importante papel na insuficiência do tibial posterior e influenciam simultaneamente o processo de tendinopatia deste.

Podemos sugerir que o polimorfismo -1607 da MMP-1 é dos polimorfismos estudados o mais determinante na tendinopatia do tibial posterior, uma vez que a presença do alelo 2G foi encontrado em todos os haplótipos de risco e o alelo 1G encontrado nos haplótipos de proteção.

Considerando-se a correção de Bonferroni a análise de haplotipos permanece significativa, sugerindo que esses SNPs apresentam efeitos simultâneos na tendinopatia do tibial posterior.

Observamos um desequilíbrio de ligação entre o polimorfismo -1607 da MMP-1 e os polimorfismos -519 da MMP-1 e -799 da MMP-8, sugerindo um papel importante do polimorfismo -1607 da MMP-1. Entretanto, o polimorfismo -77 da MMP-13 não apresentou desequilíbrio de ligação como os demais SNPs estudados.

Diante dos resultados obtidos das frequências alélicas e genotípicas de que, foi realizado o estudo de regressão logística múltipla utilizando modelo dominante, o qual foi agrupado em homozigotos usuais versus homozigotos não usuais somados aos heterozigotos polimórficos. Os resultados demonstraram que os SNPs tem efeito independente e sinérgico, sendo fator de risco a tendinopatia primaria do tibial posterior.

Os resultados obtidos através da análise por combinação mostram que o grupo controle apresentou quantidades menores de SNPs para cada amostra, enquanto o grupo teste apresentou na maioria das amostras maior quantidade de SNPs combinados; reforçando o sinergismo entre os SNPs e indicando efeito aditivo no desenvolvimento da tendinopatia do tibial posterior.

Estudos têm demonstrado uma desproporção de vários tipos de colágeno na tendinopatia. Na disfunção do tendão tibial posterior é observado aumento dos níveis de colágenos do tipo III, IV e V e diminuição de colágeno tipo I; o qual apresenta uma distribuição difusa e é envolvido por fibrilas do tipo III (Satomi *et. al.*, 2008). As collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) clivam todos os subtipos de colágeno, em especial as hélices triplas dos colágenos fibrilares tipos I e III (Birkedal-Hansen *et. al.*, 1993; Vincenti, 2001). Os polimorfismos estudados nessas três collagenases podem estar contribuindo para alterar os colágenos tipo I e III no tibial posterior, aumentando sua degradação e assim predispondo a tendinopatia

desse tendão. Assim, estes polimorfismos parecem ser um fator de risco significativo para tendinopatia primária do tendão tibial posterior.

Uma vez que o colágeno tipo I é o componente principal do tendão tibial posterior e a degradação deste tecido é considerada um dos fatores-chave nas lesões degenerativas, as colagenases estão fortemente associadas, já que essas iniciam eficientemente a degradação do colágeno tipo I (Sorsa *et. al.*, 2006). Embora estas MMPs 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 das MMPs fornece a base molecular para explicar uma intensa degradação do colágeno, criando condições que acentuam a tendinopatia.

É importante salientar que os resultados aqui reportados podem ser diferentes quando analisados em populações etnicamente distintas, uma vez que a origem étnica pode influenciar as frequências alélicas (Mourant *et. al.*, 1976).

Os estudos genéticos relacionados a tendinopatias publicados na literatura apresentam análise da associação 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- β 1) 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.*, 2009b; Collings; Raleigh, 2009; Posthumus; Collings, 2010). Nosso grupo foi o primeiro a estudar SNPs nesse tendão e nossos resultados mostram uma influência significativa de alelos específicos no risco à tendinopatia do tibial posterior.

O conhecimento de marcadores genéticos relacionados à tendinopatia primária do tendão tibial posterior possibilita a identificação de indivíduos suscetíveis e a análise de polimorfismos em MMPs relacionados tem valor clínico significativo, aumentando o entendimento da fisiopatogenia da degeneração desse tendão.

No futuro, a investigação de outros marcadores genéticos poderá definir e padronizar os principais 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 suscetíveis à insuficiência do tendão tibial posterior.

7 CONCLUSÃO

Os polimorfismos rs2252070 na região promotora do gene da MMP-13 (-77); rs1144393 da MMP-1 (-519); rs1799750 da MMP-1 (-1607) e o rs11225395 da MMP-8 (-799) estão associados à tendinopatia primária do tibial posterior, e podem ser utilizados como marcador genético de risco à insuficiência do tendão tibial posterior.

Combinações haplotípicas dos polimorfismos da MMP-1 (-1607 e -519) (rs1799750 e rs1144393); MMP-8 (-799) (rs11225395) e MMP-13 (-77) (rs2252070) influenciam a tendinopatia primária no tibial posterior em mulheres, sendo, o haplótipo T-G-2G-A de risco e o C-A-1G-A de proteção a esta tendinopatia.

Os resultados da regressão logística múltipla demonstraram que os SNPs tem efeito independente e sinérgico, sendo fator de risco a tendinopatia primária do tibial posterior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE M, GRAVARE SILBERNAGEL K, SILJEHOLM C, *et.al.*, Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration?. *Arthritis Res*,11:235, 2009.

ADAMO CT, MAILHOT JM, SMITH AK, BORKE JL. Connexin-43 expression in oral-derived human osteoblasts after transforming growth factor-beta and prostaglandin E2 exposure. *J Oral Implantol*,27: 25-31, 2001.

AIDAR M, LINE SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*,18:148-152, 2007.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. *Biologia Molecular da Célula*. Editora Artmed,4 ed, 1111, 2004.

ALA-AHO, R., M, AHONEN, S, J, GEORGE, J, HEIKKILA, R, GRENNAN, M, KALLAJOKI, AND V, M, KAHARI. Targeted inhibition of human collagenase-3 (MMP-13) expression inhibits squamous cell carcinoma growth in vivo. *Oncogene* 23:5111–5123, 2004.

ARECHA VALETA-VELASCO F, CUEVAS-ANTONIO R, DOMINGUEZ-LOPEZ P, ESTRADA-MOSCOSO I, IMANI-RAZAVI FS, ZEFERINO-TOQUERO M, DIAZ-CUETO L. Matrix metalloproteinase-8 promoter gene polymorphisms in Mexican women with ovarian cancer. *Med Oncol*,31(8):132, 2014.

BARLAS IO, SEZGIN M, ERDAL ME, SAHIN G, ANKARALI HC, Altintas ZM, TURKMAN E. Association of (-1,607) 1G/2G polymorphism of matrix metalloproteinase-1 gene with knee osteoarthritis in the Turkish population (knee osteoarthritis and MMPs gene polymorphisms). *Rheumatol, Int*, 29:383-388, 2009.

BARONEZA JE, GODOY-SANTOS A, FERREIRA MASSA B, BOÇON DE ARAUJO MUNHOZ F, DINIZ FERNANDES T, LEME GODOY DOS SANTOS MC. MMP-1 promoter genotype and haplotype association with posterior tibial tendinopathy. *Gene*, 547(2):334-7, 2014 .

BASSET P, OKADA A, CHENARD MP, KANNAN R, STOLL I, ANGLARD, P, BELLOCQ JP, RIO MC, Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications, *Matrix Biol*, 1997; 15: 535–541.

BIRKEDAL-HANSEN H, MOORE WG, BODDEN MK, WINDSOR LJ, BIRDEDAL-HANSEN B, DECARLO A, *et. al.*, Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4: 197-250, 1993.

BRINCKERHOFF CE, RUTTER JL, BENBOW U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res*, (12):4823-30, 2000.

BUTLER G S,& OVERALL C M. Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new “intracellular” substrates revealed by degradomics. *Biochemistry*, 48, 10830–10845, 2009.

CARGILL M, ALSHULER D, IRELAND J, SKLAR P, DALEY GQ & LANDER ES. Characterization of single-nucleotide polymorphism in coding regions of human genes. *Nat Genet*, 22: 231-238, 1999.

CHEN Y, NIXON NB, DAWES PT, MATTEY DL. Influence of variations across the MMP-1 and -3 genes on the serum levels of MMP-1 and -3 and disease activity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun*, 13(1):29-37, 2012.

CHEHAIBI K, HRIRA MY, NOUIRA S, MAATOUK F, BEN HAMDA K, SLIMANE MN. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and the risk of ischemic stroke in a Tunisian population. *J Neurol Sci*, 342(1-2):107-13, 2014.

COLLINGS M, RALEIGH SM. Genetics risk factors for musculoskeletal soft tissue injuries. *Med Sport Sci*, 54:136-49, 2009.

COSTA-JUNIOR FR, ALVIM-PEREIRA CC, ALVIM-PEREIRA F, TREVILATTO PC, DE SOUZA AP, SANTOS MC. Influence of MMP-8 promoter polymorphism in early osseointegrated implant failure. *Clin Oral Investig*, 17(1):311-6, 2013.

COTRIM P. *et. al.*, Expression and activity of metalloproteinase-2 (MMP-2) in the development of rat first molar tooth germ. *Braz. Dent. J.* v.13, n.2, p.97- 102, 2002.

DEDONG H, BIN Z, PEISHENG S, HONGWEI X, QINGHUI Y. The Contribution of the Genetic Variations of the Matrix Metalloproteinase-1 Gene to the Genetic Susceptibility of Gastric Cancer. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2014.

DEL BUONO A, OLIVA F, LONGO UG, RODEO SA, ORCHARD J, DENARO V, AND MAFFULLI. Metalloproteases and rotator cuff disease, *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons*, 21: 200-208, 2012.

DELAND JT, DE ASLA RJ, SUNG IH, EMBERG LA, POTTER HG. Posterior tibial tendon insufficiency which ligaments are involved?. *Foot Ankle Int*, 26(6):427-35, 2005.

DEY S, GHOSH N, SAHA D, KESH K, GUPTA A, SWARNAKAR S. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) Promoter polymorphisms are well linked with lower stomach tumor formation in eastern Indian population. *PLoS One*, 9(2):e88040, 2014.

DJURIĆ T, STANKOVIĆ A, KONČAR I, RADAK D, DAVIDOVIĆ L, ALAVANTIĆ D, ŽIVKOVIĆ M. Association of MMP-8 promoter gene polymorphisms with carotid atherosclerosis: preliminary study. *Atherosclerosis*, 219(2):673-8, 2011.

DJURIC T, ZIVKOVIC M, MILOSEVIC B, ANDJELEVSKI M, CVETKOVIC M, KOSTIC M, STANKOVIC A. MMP-1 and -3 haplotype is associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract, *Pediatric Nephrol*, 29(5):879-84, 2014.

DYAL, C; FEDER, J; DELAND JT, et, al., Pes Planus in patients with posterior tibial tendon insufficiency: asymptomatic versus symptomatic foot. *Foot and Ankle Internat*, 181:24-27, 1987.

EGEBLAD M, WERB Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat, Rev, Cancer*, 2:161–174, 2002.

ELKINGTON P, SHIOMI T, BREEN R, NUTTALL RK, UGARTE-GIL CA, et. al., MMP-1 drives immunopathology in human tuberculosis and transgenic mice. *J Clin Invest*, 121: 1827–1833, 2011.

EMINGIL G, HAN B, GÜRKAN A, BERDELI A, TERVAHARTIALA T, SALO T, PUSSINEN PJ, KÖSE T, ATILLA G, SORSA T. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and tissue inhibitor of MMP-1 (TIMP-1) gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis: gingival crevicular fluid MMP-8 and TIMP-1 levels and outcome of periodontal therapy. *J Periodontol*, 85(8):1070-80, 2014.

FLEX A, GAETANI E, ANGELINI F, SABUSCO A, CHILLÀ C, STRAFACE G, BISCETTI F, POLA P, CASTELLOT JJ JR, POLA R. Pro-inflammatory genetic profiles in subjects with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischemia. *J Intern Med*, 262(1): 124-30, 2007.

FREY, C; SHEREFF, M; GREENIDGE N. Vascularity of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg*, 72-A:884-88, 1990.

FUNK, D; CASS JR; JOHNSON KA. Acquired adult flat foot secondary to posterior tibial-tendon pathology. *J Bone Joint Surg*, 68-A:95-102, 1986.

GAO P, YANG JL, ZHAO H, YOU JH, HU Y. Common polymorphism in the MMP-13 gene may contribute to the risk of human cancers: a meta-analysis. *Tumor Biol*, 2014.

GODOY-SANTOS AL, TREVISAN R, FERNANDES TD, SANTOS M CRISTINA LG. Association of MMP-8 polymorphisms with tendinopathy of the primary posterior tibial tendon: a pilot study. *Clinics*, 66(9):1641-1643, 2011.

GODOY-SANTOS AL, TREVISAN R, FERNANDES TD, SANTOS M CRISTINA LG. MMP-1 polymorphism is associated with tendinopathy primary posterior tibial tendon. *J Orthop Res*, 31(7):1103-7, 2013.

GODOY-SANTOS A, ORTIZ RT, MATTAR JUNIOR R, FERNANDES TD, SANTOS MC. MMP-8 polymorphism is genetic marker to tendinopathy primary posterior tibial tendon. *Scand J Med Sci Sports*, 24(1):220-3, 2014.

GONÇALVES NETO J, WITZEL SS, TEODORO WR, et. al., Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. *Joint Bone Spine*,69:189-94, 2002.

GREEN JA, ELKINGTON PT, PENNINGTON CJ, RONCAROLI F, DHOLAKIA S, et, al., Mycobacterium tuberculosis upregulates microglial matrix metalloproteinase-1 and -3 expression and secretion via NF-kappa B- and Activator Protein-1- dependent monocyte networks. *J Immunol*, 184: 6492–6503, 2010.

HADLER-OLSEN E, FADNES B, SYLTE I, UHLIN-HANSEN L, WINBERG JO. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J*,278(1):28-45, 2011.

HANNAS AR, PEREIRA JC, GRANJEIRO JM, TJÄDERHANE L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*,65(1):1-13, 2007.

HANNAS AR. Determinação da expressão de MMP-2 e MMP-9 na saliva de pacientes portadores de lesões cervicais não cariosas e da influência das MMPs sobre lesões radiculares artificiais através de EDX - (tese de doutorado) Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru; 2007.

HE X, ZHANG L, YAO X, HU J, YU L, JIA H, AN R, LIU Z, XU Y. Association studies of MMP-9 in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*,8(9):e73777, 2013.

HERMAN MP, SUKHOVA GK, LIBBY P, GERDES N, TANG N, HORTON DB, KILBRIDE M, BREITBART RE, CHUN M, SCHÖNBECK U. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*, 16;104(16):1899-904, 2011.

HOLMES GB JR, MANN RA. Possible epidemiological factors associated with rupture of the posterior tibial tendon. *Foot Ankle*,(2):70-9, 1992.

HORNE BD, MAY HT, ANDERSON JL, KFOURY AG, BAILEY BM, MCCLURE BS, et. al., Usefulness of routine periodic fasting to lower risk of coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography. *M J Cardiol*,1;102(7):814-819, 2008.

HSIEH MH, CHOU PC, CHOU CL, HO SC, JOA WC, CHEN LF, SHENG TF, LIN HC, WANG TY, CHANG PJ, WANG CH, KUO HP. Matrix metalloproteinase-1 polymorphism (-1607G) and disease severity in non-cystic fibrosis bronchiectasis in Taiwan. *PLoS One*,8(6), 2013.

HU C, WANG J, XU Y, LI X, CHEN H, BUNJHOO H, XIONG W, XU Y, ZHAO J. Current evidence on the relationship between five polymorphisms in the matrix metalloproteinases (MMP) gene and lung cancer risk: a meta-analysis. *Gene*, 517(1):65-71, 2013.

HUNTLEY GW. Synaptic circuit remodelling by matrix metalloproteinases in health and disease. *Nature Reviews*, 13: 743-757, 2012.

IWAMOTO N, KAWAKAMI A, ARIMA K, TAMAI M, NAKAMURAH, KAWASHIRI SY, KITA J, OKADA , KOGA T, *et al.*, Contribution of an adenine to guanine single nucleotide polymorphism of the matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) 277 promoter region to the production of anticyclic citrullinated peptide antibodies in patients with HLA-DRB1*shared epitope-negative rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*, 21:240-243, 2011.

JAHSS MH. Spontaneous rupture of the tibialis posterior tendon: clinical findings, tenographic studies, and a new technique of repair. *Foot and Ankle*, 3:158-166, 1982.

JAHSS MH. Tendon disorders of the foot and ankle, In *Disorders of the Foot and Ankle. Medical and Surgical Management*, pp1461-1513, Edited by M,H, Jahss, Philadelphia, W, B, Saunders, 1991.

JAWORSKI D M. Developmental regulation of membrane type-5 matrix metalloproteinase (MT5-MMP) expression in the rat nervous system. *Brain Res*, 860, 174–177, 2000.

JI SR, SUN JJ, LI XP, ZHANG Y, LIU WF. The association of matrix metalloproteinase-1 genetic polymorphism (-1607 1G>2G) with colorectal cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol*, 34(6):3801-6, 2013.

JIA J, KANG S, ZHAO J, ZHANG X, WANG N, ZHOU R, LI Y. Association of functional polymorphisms on MMP-12 and MMP-13 gene promoter region with epithelial ovarian carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 27(2):209-13, 2010.

JOHNSEN M, LUND LR, ROMER J, ALMHOLDT K, DANO K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol*, 10: 667–671, 1998.

JOHNSON KA. Tibialis posterior tendon rupture. *Clin Orthop*, 177:140-47, 1983.

JOHNSON KA, STROM DE. Tibialis posterior tendon dysfunction. *Clin Orthop Relat Res*, 239: 196-206, 1989.

JONES GC, CORPS AN, PENNINGTON CJ, *et al.*, Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human achilles tendon. *Arthritis Rheum*, 54:832–42, 2006.

JOOS L, HE JQ, SHEPHERDSON MB, CONNETT JE, ANTHONISEN NR, *et al.*, The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet*, 11: 569–576, 2002.

JOSEPH M, MARESH CM, MCCARTHY MB, KRAEMER WJ, LEDGARD F, ARCIERO CL, ANDERSON JM, NINDL BC, MAZZOCCA AD. Histological and molecular analysis of the biceps tendon long head post-tenotomy. *J Orthop Res*, 27(10):1379-1385, 2009.

KETTELKAMP DB, ALEXANDER HH. Spontaneous rupture of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg*, 51-A:759-64, 1969.

KIDNER FC. The prehallux in relation to flatfoot. *J. Am. Med. Assn*, 101:1539-1542, 1933.

KNAUPER V, OSTHUES A, DECLERCK YA, LANGLEY KE, BLASER J, TSCHEESCHE H. Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase. *Biochem J*, 291; 847-854, 1993.

KÖHRMANN A, KAMMERER U, KAPP M, DIETL J, ANACKER J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: new findings and review of the literature. *BMCCancer*, 90:188, 2006.

KORPI JT, ASTRÖM P, LEHTONEN N, TJÄDERHANE L, KALLIO-PULKKINEN S, SIPONEN M, SORSA T, PIRILÄ E, SALO T. Healing of extraction sockets in collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice. *Eur J. Oral Sci*. 117(3):248-54, 2009.

KUMAR MS, VAMSI G, SRIPRIYA R, SEHGAL PK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol*, 77:1803-8, 2006.

KUO HP, WANG YM, WANG CH, HE CC, LIN SM, et.al., Matrix metalloproteinase-1 polymorphism in Taiwanese patients with endobronchial tuberculosis. *Tuberculosis*, 88: 262–267, 2008.

KUULA H, SALO T, PIRILÄ E, TUOMAINEN AM, JAUHIAINEN M, UITTO VJ, TJÄDERHANE L, PUSSINEN PJ, SORSA T. Local and systemic responses in matrix metalloproteinase 8-deficient mice during *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis. *Infect Immun*. 77(2):850-9, 2009.

LAKEMEIER S, SCHWUCHOW SA, PETERLEIN CD, FOELSCH C, FUCHS-WINKELMANN S, ARCHONTIDOU-APRIN E, PALETTA JRJ, SCHOFER M D. Expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 in degenerated long head biceps tendon in the presence of rotator cuff tears: an immunohistological study. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 11:271, 2010.

LAXTON RC, HU Y, DUCHENE J, ZHANG F, ZHANG Z, LEUNG KY, XIAO Q, SCOTLAND RS, HODGKINSON CP, SMITH K, WILLEIT J, LÓPEZ-OTÍN C, SIMPSON IA, KIECHL S, AHLUWALIA A, XU Q, YE S. A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Circ Res*, 23;105(9):921-9, 2009.

LEE J, KIM HR, MIN JW, PARK JS, JIN SM, HAN SK, SHIM YS, YIM JJ. Lack of association between matrix metalloproteinase 8 promoter polymorphism and bronchiectasis in Koreans. *J Korean Med. Sci*, 2007.

LENGLET S, MONTECUCCO F, MACH F. Role of matrix metalloproteinases in animal models of ischemic stroke. *Current Vasc. Pharmacol*. 2013.

LI D, CAI Q, MA L, WANG M, MA J, ZHANG W, PAN Y, WANG L. Association between MMP-1 g,-1607dupG polymorphism and periodontitis susceptibility: a meta-analysis. *PLoS One*, 8(3):e59513, 2013.

LI C, JIN XP, ZHU M, CHEN QL, WANG F, HU XF, WANG WF, LI WL, ZHU F, ZHENG Z. Positive association of MMP 14 gene polymorphism with vulnerable carotid plaque formation in a Han Chinese population. *Scand J Clin Lab Invest*, 74(3):248-53, 2014.

LIN TH, YANG SF, CHIU CC, SU HM, WANG CL, VOON WC, LAI WT, SHEU SH. Matrix metalloproteinase-1 mitral expression and -1607 1G/2G gene promoter polymorphism in mitral chordae tendinae rupture. *Transl Res*, 161(5):406-13, 2013.

LO IK, MARCHUK LL, HOLLINSHEAD R, HART DA, FRANK CB. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase mRNA levels are specifically altered in torn rotator cuff tendons. *Am J. Sports Med*, 32:1223–1229, 2004.

LOMBARDI F, BELLETTI S, BATTEZZATI PM, PACCIOLLA R, BIONDI ML. MMP-1 and MMP-3 polymorphism and arrhythmia recurrence after electrical cardioversion in patients with persistent atrial fibrillation. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 12(1):37-42, 2011.

LYNCH CC, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation*. 70(9-10):561-73, 2002.

MADISCH A, HELLMIG S, SCHREIBER S, BETHKE B, STOLTE M, MIEHLKE S. Allelic variation of the matrix metalloproteinase-9 gene is associated with collagenous colitis. *Inflamm Bowel Dis*, (11):2295-8, 2011.

MAGRA M, MAFFULLI N. Genetic aspects of tendinopathy. *J Sci Med Sport*, 11(3):243-7, 2008.

MANIATIS A, TSAKANIKAS S, STAMATELLOU M, PAPANASTASIOU K. Intermediate-dose melphalan for refractory myeloma. *Blood*. 15;74(3):1177, 1989.

MALILA S, YUKTANANDANA P, SAOWAPRUT S, JIAMJARASRANGSI W, HONSAWEK S. Association between matrix metalloproteinase-3 polymorphism and anterior cruciate ligament ruptures, *Genet Mol Res*, 2011, 31;10(4) (Epub ahead of print), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22057989>, Access in 03,15,2012.

MANN, RA. Flatfoot in Adults, In *Surgery of the Foot and Ankle*, edited by R, A, Mann and M, J, Coughlin, Ed 6, pp 757-784, St Louis, C, V, Mosby, 1993.

MCGEEHAN G, BURKHART W, ANDEREGG R, BECHERER JD, GILLIKIN JW, GRAHAM JS. Sequencing and characterization of the soybean leaf metalloproteinase: structural and functional similarity to the matrix metalloproteinase family. *Plant Physiol*, 99:1179–1183, 1992.

MCLAUHLAN GJ, HANDOLL HHG. Interventions for treating acute and chronic Achilles tendinitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2001;2.

MCQUIBBAN GA, GONG JH, WONG JP, WALLACE JL, CLARK-LEWIS I, OVERALL CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood*, 100:1160–1167, 2002.

MICHALOWICZ BS, DIEHL SR, GUNSOLLEY JC, SPARKS BS, BROOKS CN, KOERTGE TE, CALIFANO JV, BURMEISTER JA, SCHENKEIN HA. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis, 71(11):1699-707, 2000.

MOILANEN M, PIRILÄ E, GRÉNMAN R, SORSA T, SALO T. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol*, 197(1):72-81, 2002.

MOKONE GG, GAJJAR M, SEPTEMBER AV, SCHWELLNUS MP, GREENBERG J, NOAKES TD, COLLINS M. The guanine-thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C gene is associated with achilles tendon injuries. *Am J. Sports Med*, 33(7):1016-1021, 2005.

MOKONE GG, SCHWELLNUS MP, NOAKES TD, COLLINS M. The COL5A1 gene and Achilles tendon pathology. *Scand J. Med Sci Sports*, 16(1):19-26, 2006.

MOS M, VAN EL B, DEGROOT J, JAHR H, VAN SCHIE HT, VAN ARKEL ER, TOL H, HEIJBOER R, VAN OSCH GJ, VERHAAR JA. Achilles tendinosis: changes in biochemical composition and collagen turnover rate. *Am J. Sports Med*, 35:1549–1556, 2007.

MOTT DJ, WERB Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases *Current Opinion in Cell Biology*, 16:558–564, 2004.

MOTTA GDAR, AMARAL MV, REZENDE E, PITTA R, VIEIRA TC, DUARTE ME, VIEIRA AR, CASADO PL. Evidence of genetic variations associated with rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg*, 23(2):227-35, 2014.

MOURANT AE, TILLS D, DOMANIEWSKA-SOBCZAK K. Sunshine and the geographical distribution of the alleles of the Gc system of plasma proteins. *Human Genet.* 30;33(3):307-14, 1976.

NABESHIMA K, SHIMAO Y, INOUE T, SAMESHIMA T. Matrix metalloproteinases (MMP) in lung cancer. *Nihon Rinsho.* 60, 5:103-9, 2002.

NAGASE H, AND WOESSNER JF. Matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry*, 274: 21491-21494, 1999.

NAGASE H, VISSE R, MURPHY G. Structured function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 69 (3):562-73, 2006.

NASR HB, MESTIRI S, CHAHED K, BOUAOUINA N, GABBOUJ S, JALBOUT M, CHOUCANE L. Matrix metalloproteinase-1 (-1607) 1G/2G and -9 (-1562) C/T promoter polymorphisms: susceptibility and prognostic implications in nasopharyngeal carcinomas. *Clin Chim Acta*, (1-2):57-63, 2007.

NEWBY AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*, 85:1–31, 2005.

NIE SW, WANG XF, TANG ZC. Correlations between MMP-2/MMP-9 promoter polymorphisms and ischemic stroke. *Int J Clin Exp Med*, 2014.

NISHIZAWA R, NAGATA M, NOMAN AA, KITAMURA N, FUJITA H, HOSHINA H, KUBOTA T, ITAGAKI M, SHINGAKI S, OHNISHI M, KURITA H, KATSURA K, SAITO C, YOSHIE H, TAKAGI R. 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*, 5;7:187, 2007.

OLEJNICZAK I, FENDLER W, BOROWIEC M, MŁYNARSKI W, PIETRUSZEWSKA W. Polymorphism of metalloproteinases MMP-1 and MMP-2 in risk of laryngeal cancer. *Otolaryngol Pol*, 2012.

OKADA Y, NAKA K, KAWAMURA K, MATSUMOTO T, NAKANISHI I, FUJIMOTO N, SATO H, SEIKI M. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest*, 72: 311-322, 1995.

PALOSAARIH, WAHLGREN J, LARMAS M, RÖNKÄ H, SORSA T, SALO T, TJÄDERHANE L. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. *J Dent Res*, 79(1):77-84, 2000.

PAN Y, LI D, CAI Q, ZHANG W, MA J, WANG M, WANG L. MMP-9 -1562C>T contributes to periodontitis susceptibility. *J Clin Periodontol*, 40(2):125-30, 2013.

PARK KS, KIM SJ, KIM KH, KIM JC. Clinical characteristics of TIMP2, MMP2, and MMP9 gene polymorphisms in colorectal cancer, *J Gastroenterol Hepatol*, 26(2): 391-397, 2011.

PEREIRA AC, DIAS DO CARMO E, DIAS DA SILVA MA, BLUMER ROSA LE. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and oral cancer. *J Clin Exp Dent*, 4(5):e297-301, 2012.

PIRHAN D, ATILLA G, EMINGIL G, TERVAHARTIALA T, SORSA T, BERDELI A. MMP-13 promoter polymorphisms in patients with chronic periodontitis: effects on

GCF MMP-13 levels and outcome of periodontal therapy. *J Clin Periodontol*, 36: 474–481, 2009.

PIRILÄ E, RAMAMURTHY NS, SORSA T, SALO T, HIETANEN J, MAISI P. Gelatinase A (MMP-2), collagenase-2 (MMP-8), and laminin-5 gamma2-chain expression in murine inflammatory bowel disease (ulcerative colitis). *Dig Dis Sci*, 48(1):93-8, 2003.

PRIKK K, MAISI P, PIRILÄ E, SEPPER R, SALO T, WAHLGREN J, SORSA T. In vivo collagenase-2 (MMP-8) expression by human bronchial epithelial cells and monocytes/macrophages in bronchiectasis. *J Pathol*, 194(2):232-8, 2001.

PRIVALOVA EV, KAPLUNOVA VY, KOZHEVNIKOVA MV, KHABAROVA NV, SHAKARYANTS GA, BELENKOV YN. Kardiologia, Matrix metalloproteinases and hypertrophic cardiomyopathy. *J Neurol Sci*, 54(5):4-7, 2014.

POMEROY GC, MAINE SP, PIKE RH et al., Current Concepts Review - Acquired Flatfoot in Adults Due to Dysfunction of the Posterior Tibial Tendon. *J Bone Joint Surg Am*, 81-A:1173-82, 1999.

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

POSTHUMUS M, SEPTEMBER AV, O'CUINNEAGAIN D, et al., The COL5A1 gene is associated with increased risk of anterior cruciate ligament ruptures in female participants. *Am J Sports Med*, 37(11):2234-40, 2009.

POSTHUMUS M, SEPTEMBER AV, SCHWELLNUS MP, COLLINS M. Investigation of the Sp1-binding site polymorphism within the COL1A1 gene in participants with Achilles tendon injuries and controls. *J Sci Med Sport*, 12(1): 184-189, 2009.

RA MANN, MJ COUGHLIN (EDS.) *Surgery of the foot and ankle*. Mosby-year book inc, 6th ed, st. Louis; 1993: 757–784.

RA HJ, PARKS WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol*. 26: 587–596, 2007.

RILEY G. The pathogenesis of tendinopathy, a molecular perspective. *Rheumatology* 43: 131-142, 2004.

RIVERA S, KHRESTCHATISKY M, KACZMAREK L, ROSENBERG G A e JAWORSKI D M. Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology?. *J. Neurosci*, 30:15337–15357, 2010.

RODERFELD M, RATH T, SCHULZ R, SEEGER W, TSCHUSCHNER A, GRAF J, ROEB E. Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation. *J Cyst Fibros*, 8(5):338-47, 2009.

ROLF C, MOVIN T. Etiology, histopathology and outcome of surgery in achillodynia. *Foot Ankle Int*, 18: 565-569, 1997.

RUTTER JL, MITCHELL TI, BUTTICÈ G, MEYERS J, GUSELLA JF, OZELIUS LJ, BRINCKERHOFF CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res*. 1998, 1;58(23):5321-5.

SAEED HM, ALANAZI MS, ALSHAHRANI O, PARINE NR, ALABDULKARIM HA, SHALABY MA. Matrix metalloproteinase-2 C(-1306)T promoter polymorphism and breast cancer risk in the Saudi population. *Acta Biochim Pol*, 60(3):405-9, 2013.

SAEED HM, ALANAZI MS, PARINE NR, SHAIK J, SEMLALI A, ALHARBI O, AZZAM N, ALJEBREEN A, ALMADI M, SHALABY MA. Matrix metalloproteinase-2 (-1306 c>t) promoter polymorphism and risk of colorectal cancer in the Saudi population, *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(10):6025-30, 2013.

SANLI M, AKAR E, PEHLIVAN S, BAKIR K, TUNCOZGUR B, ISIK AF, PEHLIVAN M, ELBEYLI L. The relationship of metalloproteinase gene polymorphisms and lung cancer. *J Surg Res*. 183(2):517-23, 2013.

SARACINI C, BOLLI P, STICCHI E, PRATESI G, PULLI R, SOFI F, PRATESI C, GENSINI GF, ABBATE R, GIUSTI B. Polymorphisms of genes involved in extracellular matrix remodeling and abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*, 55(1):171-179, 2012.

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

SCHVEIGERT D, VALUCKAS KP, KOVALCIS V, ULYS A, CHVATOVIC G, DIDZIAPETRIENE J. Significance of MMP-9 expression and MMP-9 polymorphism in prostate cancer. *Tumori*, 99(4):523-9, 2013.

SEPPER R, KONTTINEN YT, DING Y, TAKAGI M, SORSA T. Human neutrophil collagenase (MMP-8), identified in bronchiectasis BAL fluid, correlates with severity of disease. *Chest*, 07:1641–1647, 1995.

SHALABY MA, NOUNOU HA, MS A, O A, AZZAM N, SAEED HM. Associations between single nucleotide polymorphisms of COX-2 and MMP-2 genes and colorectal cancer susceptibility in the Saudi population. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(12):4989-94, 2014.

SHAM, P C AND CURTIS, D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic *loci*. *Annals Hum Genetics*, v. 59, p.97-105, 1995.

SHAPIRO SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol*, 10: 602–608, 1998.

SINGH K, AGRAWAL NK, GUPTA SK. A functional single nucleotide polymorphism - 1562C>T in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds*,12(3):199-204, 2013.

SHIMIZU M, IMAI M. Effect of the antibody immunotherapy by the anti-MUC1 monoclonal antibody to the oral squamous cell carcinoma in vitro. *Biol Pharm Bull*,(12):2288-93, 2008.

SHIMODA T, OBASE Y, KISHIKAWA R, IWANAGA T. Association of matrix metalloproteinase 8 genetic polymorphisms with bronchial asthma in a Japanese population. *Allergy Rhinol*,4(3), 2013.

SKORUPSKI P, JANKIEWICZ K, MIOTŁA P, MARCZAK M, KULIK-RECHBERGER B, RECHBERGER T. The polymorphisms of the MMP-1 and the MMP-3 genes and the risk of pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J*,24(6):1033-8, 2013.

SORSA T, TJÄDERHANE L, KONTTINEN YT, LAUHIO A, SALO T, LEE HM, GOLUB LM, BROWN DL, MÄNTYLÄ P. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med*. 38(5):306-21, 2006.

SOUZA AP, TREVILATTO PC, SCARELL-CAMINAGA RM, BRITO JR, RB, LINE SRP. MMP1 Promoter Polymorphism: Association With Chronic Periodontitis Severity In A Brazilian Population. *J Clin Periodontol*,30: 154-158, 2003.

SOUZA AP, LINE SRP. The biology of metalloproteinases. *J Appl Oral Sci*, 10 (1):1-6, 2002.

SPINALE FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*. 87(4):1285-3422007.

SRI MANJARI K, NALLARI P, BALAKRISHNA N, VIDYASAGAR A, PRABHAKAR B, JYOTHY A, VENKATESHWARI A. Influence of matrix metalloproteinase-1 gene - 1607 (1G/2G) (rs1799750) promoter polymorphism on circulating levels of MMP-1 in chronic pancreatitis. *Biochem Genet*,51(7-8):644-54, 2013.

STAMENKOVIC I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastases. *Cancer Biology*, v.10, 415-33, 2000.

STERNLICHT M D, e WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu, Rev, Cell Dev, Biol*,17, 463–516, 2001.

SUN R, HUANG Y, ZHANG H, LIU R. MMP-2, TNF- α and NLRP1 polymorphisms in Chinese patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep*,40(11):6303-8, 2013.

TASCI Y, CAGLAR GS, KAYIKCIOGLU F, CENGIZ H, YAGCI B, GUNES M. Treatment of menorrhagia with the levonorgestrel releasing intrauterine system: effects on ovarian function and uterus. *Gynecol Obstet*, (1):39-42, 2009.

TANNURE PN, KÜCHLER EC, FALAGAN-LOTSCH P, AMORIM LM, RAGGIO LUIZ R, COSTA MC, VIEIRA AR, GRANJEIRO JM. MMP13 polymorphism decreases risk for dental caries. *Caries Res*, 46(4):401-7, 2012.

THOMPSON MW, MCINNES RR, WILLARD HF, THOMPSON & THOMPSON: *Genetics in Medicine*. 5.ed, Pensilvania: Philadelphia, p 500, 1991.

TREVILATTO PC, LINE SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*, 18: 6–9, 2000.

TROVÓ DE MARQUI AB. Genetic polymorphisms and endometriosis: contribution of genes that regulate vascular function and tissue remodeling. *Rev Assoc Med Bras*, 58(5):620-32, 2012.

VAŠKŮ A, MELUZÍN J, BLAHÁK J, KINCL V, GOLDBERGOVÁ MP, SITAR J, ZLÁMAL F, BIENERTOVÁ-VAŠKŮ J, VÍTOVEC J. Matrix metalloproteinase 13 genotype in rs640198 polymorphism is associated with severe coronary artery disease. *Dis Markers*, 33(1):43-9, 2012.

VECIL G G, et.al., Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J. Neurosci, Res*, 61, 212–224, 2000.

VIHINEN P, KOSKIVUO I, SYRJÄNEN K, TERVAHARTIALA T, SORSA T, PYRHÖNEN S. Serum matrix metalloproteinase-8 is associated with ulceration and vascular invasion of malignant melanoma. *Melanoma Res*, 18(4):268-73, 2008.

VINCENTI MP, COON CI, WHITE LA, BARCHOWSKY A, BRINCKERHOFF CE. Src-related tyrosine kinases regulate transcriptional activation of the interstitial collagenase gene, MMP-1, in interleukin-1-stimulated synovial fibroblasts(4):574-82, 1996.

WAHLGREN J, MAISI P, SORSA T, SUTINEN M, TERVAHARTIALA T, PIRILÄ E, TERONEN O, HIETANEN J, TJÄDERHANE L, SALO T. Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *J Pathol*, 194(2):217-24, 2001.

WANG CH, LIN HC, LIN SM, HUANG CD, LIU CY, et al., MMP-1(-1607G) polymorphism as a risk factor for fibrosis after pulmonary tuberculosis in Taiwan. *Int J Túbero, LeungDis*, 14: 627–634, 2010.

WANG WF, WANG F, ZHU M, HUANG J, ZHOU YL, LIN XF, HU XF, LI WL, ZHANG XL, JIN XP. Association between matrix metalloproteinase-8 -

799C/T polymorphism and instability of carotid plaque. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 29(1):60-3, 2012.

WESTERMARCK J, KÄHÄRI VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*. 13(8):781-92, 1999.

WIECZOREK E, RESZKA E, GROMADZINSKA J, WASOWICZ W. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinases in breast cancer. *Neoplasma*, 59(3):237-47, 2012.

WOESSNER Jr JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, 8: 2145- 2154, 1991.

WOESSNER F, NAGASE H. *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford Univ. Press; Oxford, UK, 2000.

WOO M, PARK K, NAM J AND KIM J C. Clinical implications of matrix metalloproteinase-1, -3, -7, -9, -12, and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in colorectal cancer. *J. Gastroenterol, Hepatol*, 22 1064–1070, 2007.

WU S, LU S, TAO H, ZHANG L, LIN W, SHANG H, XIE J. Correlation of polymorphism of IL-8 and MMP-7 with occurrence and lymph node metastasis of early stage cervical cancer. *J Huazhong Univ Sci Technology Med Sci*, 31(1): 114-119, 2011.

WU HD, BAI X, CHEN DM, CAO HY, QIN L. Association of genetic polymorphisms in matrix metalloproteinase-9 and coronary artery disease in the Chinese Han population: a case-control study. *Genet Test Mol Biomarkers*, 17(9):707-12, 2013.

XIAO XY, WANG XD, ZANG DY. MMP1-1607 1G/2G polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis. *Tumour Biol*, 33(6):2385-92, 2012.

YANG X, LIU Y, YANG Y, LI B. Update meta-analysis on MMP-7 -181A>G polymorphism and cancer risk: evidence from 25 studies. *Gene*, 521(2):252-8, 2013.

YAN Y, LIANG H, LI T, LI M, LI R, QIN X, LI S. The MMP-1, MMP-2, and MMP-9 gene polymorphisms and susceptibility to bladder cancer: a meta-analysis. *Tumor Biol*, 35(4):3047-52, 2014.

YE S, Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases, *Matrix Biol*, 19: 623–639, 2000.

YE S, Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome, *Cardiovasc, Res*, 69: 636-645, 2006.

YE S, PATODI N, WALKER-BONE K, READING I, COOPER C, DENNISON E. Variation in the matrix metalloproteinase-3, -7, -12 and -13 genes is associated with functional status in rheumatoid arthritis. *Int J Immunogenet*, 34 (2):81–85, 2007.

YONG V W, Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nature Rev, Neurosci*,6, 931–944, 2005.

YOON S, KUIVANIEMI H, GATALICA Z, OLSON JM, BUTTICÈ G, YE S, NORRIS BA, MALCOM GT, STRONG JP, TROMP G. MMP13 promoter polymorphism is associated with atherosclerosis in the abdominal aorta of young black males. *Matrix Biol*,21(6):487-98, 2002.

ZHANG H, ADWANIKAR H, WERB Z, e NOBLE- HAEUSSLEIN L J. Matrix metalloproteinases and neurotrauma: evolving roles in injury and reparative processes. *Neuroscientist*,16, 156–170, 2010.

ZHOU X, GAO Y, JOHNSON NW, GAO J. Immunoexpression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in the metastasis of squamous cell carcinoma of the human tongue. *Australian Dental Journal*,55: 385-389, 2010.

ZU QQ, LIU S, XU XQ, LU SS, SUN L, SHI HB. An endovascular canine stroke model: middle cerebral artery occlusion with autologous clots followed by ipsilateral internal carotid artery blockade. *Lab Invest*, 93(7): 760-7, 2013.

APÊNDICE 1

Resultados da análise dos haplótipos pelo programa SHESIS online software de livre acesso pelo endereço eletrônico: <http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>.

Haplótipos	Controle nº	Controle %	Teste nº	Teste %	Qui-Quadrado	OR (95% IC)
C-A-1G-A	46.55	0,233	7.76	0,039	32,602	0,130(0,059~0,286)
C-A-1G-G	14.68	0,073	4.38	0,022	5,892	0,281 (0,095~0,833)
T-A-1G-A	18.76	0,094	7.99	0,040	4,692	0,399 (0,170~0,939)
T-A-1G-G	7.24	0,036	3.38	0,017	-	-
C-A-2G-A	12.54	0,063	12.32	0,062	0,003	0,979 (0,434~2,211)
C-A-2G-G	6.16	0,031	7.68	0,038	-	-
T-A-2G-A	6.06	0,030	20.33	0,102	8,296	3,644 (1,435~9,251)
T-A-2G-G	0	0,00	10.16	0,051	9,497	942,583 (56,555~15709.716)
C-G-1G-A	33.67	0,168	2.69	0,013	29,366	0,066 (0,019~0,233)
C-G-1G-G	10.61	0,053	10.52	0,053	0,001	0,989 (0,411~2,381)
T-G-1G-A	14.68	0,073	11.41	0,007	11,474	0,089 (0,016~0,0507)
T-G-1G-G	3.81	0,019	5.88	0,029	-	-
C-G-2G-A	14.30	0,071	31.68	0,158	7,491	2,467 (1,273~4,782)
C-G-2G-G	5.49	0,027	10.98	0,055	1,908	2,061 (0,724~6,866)
T-G-2G-A	5.44	0,027	37.82	0,189	27,431	8,487 (3,365~21,404)
T-G-2G-G	0	0,00	25.02	0,125	26,820	-

APÊNDICE 2

Resultados da análise dos haplótipos pelo programa Phases de livre acesso pelo endereço eletrônico (<http://www.bioinf.man.ac.uk/phase/>).

	Haplótipos	Controle nº	Controle %	Teste nº	Teste %	Valor de p
1	C-A-1G-A	44	0,229	7	0,031	p < 0,001
2	C-A-1G-G	16	0,074	7	0,028	
3	T-A-1G-A	24	0,098	7	0,030	
4	T-A-1G-G	7	0,030	6	0,023	
5	C-A-2G-A	13	0,068	9	0,064	
6	C-A-2G-G	4	0,028	8	0,037	
7	T-A-2G-A	4	0,027	24	0,097	
8	T-A-2G-G	0	0,00	6	0,056	
9	C-G-1G-A	30	0,168	2	0,022	
10	C-G-1G-G	14	0,055	10	0,042	
11	T-G-1G-A	11	0,074	1	0,015	
12	T-G-1G-G	4	0,020	4	0,025	
13	C-G-2G-A	20	0,068	37	0,150	
14	C-G-2G-G	3	0,026	8	0,062	
15	T-G-2G-A	6	0,025	35	0,196	
16	T-G-2G-G	0	0,00	29	0,114	

ANEXO 1



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/03/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0901/09**, intitulado: " **PAPEL DO POLIMORFISMO DOS GENES QUE EXPRESSAM AS METALOPROTEASES NA TENDINOPATIA PRIMÁRIA DO TENDÃO TIBIAL POSTERIOR.**" apresentado pelo Departamento de **ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

CAPPesq, 11 de Março de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

ANEXO 2

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP e UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ- UFPR**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

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

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

Grau de parentesco

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

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

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: *Papel do polimorfismo dos genes que expressam as metaloproteases na tendinopatia primária do tendão tibial posterior.*

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP e UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ- UFPR**

➤ As lesões dos tendões por degeneração têm explicações ligadas a traumatismos, a problemas de circulação sanguínea e problemas dos nervos, mas muitas doenças que levam à degeneração dos tendões ainda permanecem sem uma explicação médica adequada. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa esclarecer os motivos que causam as

degenerações dos tendões do pé. Por esse motivo, a possibilidade de causas genéticas para essas lesões precisam ser estudadas e o objetivo desse estudo é investigar a frequência dos genes em pacientes com diagnóstico de lesão do tendão tibial posterior, para verificar a possível relação entre o polimorfismo genético e o desenvolvimento dessa doença.

- Esse estudo será feito com um único exame mediante coleta simples de saliva. Os pacientes selecionados farão bochecho com água e açúcar e, em seguida, cuspirão em um recipiente plástico pequeno. A leitura das informações genéticas presentes na saliva é exame de alta tecnologia não rotineiro no nosso meio. Não haverá outros exames ou procedimentos invasivos.
- Não haverá desconfortos ou riscos na coleta e execução desse exame.
- Em relação aos benefícios para os participantes, não há benefício direto para o participante; trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que fatores genéticos interfiram na degeneração dos tendões.
- Com esse estudo, poderemos concluir a presença de algum benefício aos pacientes.
- Está garantido o acesso, em qualquer etapa do estudo, aos achados da pesquisa, ao seu prontuário e aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Os responsáveis pelo estudo são o Prof. Dr. Túlio Diniz Fernandes e a Prof^ª Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, que podem ser encontrados respectivamente nos endereços: Rua Ovídio Pires de Campos, nº 333, 3º andar, sala da Secretaria de Graduação, Instituto de Ortopedia e Traumatologia da USP, São Paulo, Capital, Brasil, pelo telefone 11-30696888 e Av. Cel. Francisco H dos Santos, s/n, Jardim das Américas, Departamento de Biologia Celular, sala 224, Curitiba, Paraná, Brasil pelo telefone 41-33611750.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) à Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, telefone 3069 6442, ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: 3069 6442, ramal 26. *E-mail*: cappel@hcnet.usp.br

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

É garantido aos participantes o direito de confidencialidade das informações obtidas no estudo, as quais serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles.

É garantido o direito aos participantes de serem mantidos atualizados sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, nem compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Há compromisso absoluto do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo *“Papel do polimorfismo dos genes que expressam as metaloproteases na tendinopatia primária do tendão tibial posterior”*.

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

Assinatura do paciente/representante legal

Data ___/___/___

Assinatura da Testemunha

Data ___/___/___

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ___ / ___ / ___

ANEXO 3

Quadro 1: Sistema de Classificação dos Estágios da insuficiência do tendão tibial posterior descrito por Johnson & Strom (1989).

Estágio	Tendão/Deformidade
I	tendinopatia/ sem deformidade
II	tendinopatia/ deformidade pé plano flexível
III	tendinopatia/ deformidade pé plano rígido